

**ISSN 0355-1180**

**HELSINGIN YLIOPISTO**

**Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta**

**Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto**

**EKT-sarja 1929**

**TERVEYDEKSI!  
PROBIOOTTIHIIVALLA VALMISTETTU OLUT  
AISTINVARAISESSA ARVIOINNISSA**

**Anna Liljeroos**

**Helsinki 2020**



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Maatalous-metsätieteellinen		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Elintarviketieteiden maisteriohjelma	
Tekijä – Författare – Author Anna Liljeroos			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Terveysteksti! Probioottihivalla valmistettu olut aistinvaraisessa arvioinnissa			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Elintarviketeknologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Maisterintutkielma		Aika – Datum – Month and year Maaliskuu 2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 40
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Olut on maailman suosituin alkoholijuoma ja sillä on pitkä historia. Useimmiten olutta valmistetaan leivinihiivalla <i>Saccharomyces cerevisiae</i>lla. Fermentoinnissa käytetty hiiva vaikuttaa tuotteen aistittaviin ominaisuuksiin. <i>Saccharomyces boulardii</i> on probioottihiiva. Tutkielmassa selvitettiin <i>S. boulardi</i>lla valmistetun vehnäoluen probioottipitoisuus sekä analysoitiin tuotetta aistinvaraisin menetelmin. <i>S. boulardii</i> hiivasta on runsaasti tutkimustietoa ja sitä käytetään ehkäisemään turistiripulia ja apuna erilaisiin suolisto-ongelmiin. Probioottisen <i>S. boulardi</i>in käyttö oluthiivana voisi aikaansaada mielenkiintoisen tuotteen, jolla on funktionaalisia ominaisuuksia.</p> <p>Tutkimuksessa valmistettiin vehnäolutta kahdella eri hiivalla, <i>S. cerevisiae</i>lla ja <i>S. boulardi</i>lla. Olutta laitettiin käymään kahteen eri lämpötilaan (20 °C ja 37 °C). Näytteitä verrattiin toisiinsa sekä kaupalliseen vehnäolueen. Yksi näyte (C37) ei vastannut laatustandardeja, joten se jätettiin pois aistinvaraisesta tutkimuksesta. Aistinvaraisella tutkimuksella selvitettiin näytteiden aistiprofiili ja keskeisimmät erottelevat tekijät. Aistinvarainen tutkimus suoritettiin koulutetulla raadilla (n=9) käyttäen kuvailevaa analyysia. Teknologisissa mittauksissa näytteistä mitattiin pH ja alkoholipitoisuus sekä määritettiin oluen värisävy. Alkoholipitoisuus mitattiin käyttäen korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC). Mikrobiologisista ominaisuuksista tutkittiin <i>S. boulardi</i>in kasvu ja säilyvyys 1, 2 ja 3 kuukauden kohdalla oluen valmistuksesta.</p> <p>Aistinvaraisessa tutkimuksessa raati arvioi kahdeksaa ominaisuutta Tilastollisesti merkittävää eroa oli vaahtoutumisella (ulkonäkö), hiilihappoisuudella (suutuntuma) sekä tunkkaisuudella (maku). B37 oli kaikilta ominaisuuksiltaan samankaltainen kuin kaupallinen olut vaikka alkoholipitoisuus jäi miedommaksi kuin muissa. Huoneenlämmössä käyneet näytteet jäivät tunkkaisen makuisiksi ja väriltään tummiksi. pH-mittauksissa happamuudessa oli vain pieniä eroja, jotka eivät ilmenneet aistinvaraisessa tutkimuksessa. Hiivaisuuden maussa ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa näytteiden välillä. Hiiva säilyi B37 näytteissä paremmin ensimmäisen kuukauden kohdalla, kun taas B20 säilyi paremmin näytteissä toisen ja kolmannen kuukauden kohdalla.</p> <p>B37 käyttäytyi aistinvaraisessa tutkimuksessa kaupallisen oluen tavoin, joten sen jatkokehitys olisi mielenkiintoista. Probioottihiiivan säilyvyys oli hyvä, joten tuotteessa on mahdollisesti potentiaalia markkinoille.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Saccharomyces boulardii</i> , hiiva, olut, aistinvarainen arviointi			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Hanna Koivula, Antti Knaapila, Per Saris			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin yliopiston digitaaliset opinnäytteet, E-thesis			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information EKT-sarja 1929.			



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Master's programme in Food Sciences
Tekijä – Författare – Author Anna Liljeroos		
Työn nimi – Arbetets titel – Title To your health! A beer made with probiotic yeast in sensory analysis		
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Food Technology		
Työn laji – Arbetets art – Level Master's Thesis	Aika – Datum – Month and year March 2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 40
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Beer is the world's most popular alcohol drink, with a long history. It is commonly made with baker's yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Yeast used for fermentation has an effect on the sensory properties of the product. <i>Saccharomyces boulardii</i> is a probiotic yeast. The objective of the thesis was to explore the use of probiotic yeast <i>S. boulardii</i> in wheat beer and develop it further with the help of sensory evaluations. <i>S. boulardii</i> is used to prevent travelers' diarrhea and as a help to many intestinal disorders. The use of probiotic yeast could make a new interesting product with functional properties.</p> <p>In the experimental part of the study beer was produced with two yeasts, <i>S. cerevisiae</i> and <i>S. boulardii</i>. The beer was matured in two different temperatures (20°C and 37°C). The four samples were compared to commercial reference product. One sample (C37) did not meet quality standards so it was left from sensory analysis. The sensory analysis was performed with 9 trained panelists by using generic descriptive analysis. Concentration for alcohol was measured with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Also pH value and the colour shade was measured. The samples were plated on agar plates to calculate colonies forming units (CFU) to test the yeast surviving in 1, 2 and 3 months time.</p> <p>Eight attributes were rated using visual analogue scales, anchored verbally at the end points. Sensory evaluation showed that the beer differed statistically significantly from each other in three attributes: appearance of foam, the mouthfeel of carbon dioxide and stale, musty smell. B37 was categorized in the same group in Tukey's test with commercial product although the alc. vol.% was lower. The samples that were fermented in the room temperature had a musty smell and they had darker colour. pH values had only minor differences and the sourness did not have statistically significant differences in sensory analysis. Yeasty taste did not vary significantly between samples. B37 maintained colonies forming units better in the first month and B20 in the second and third measurement.</p> <p>B37 was the most similar to the commercial product, so further studies are encouraged to assess right fermentation conditions. The survival of the probiotic yeast was good, so the product has potential to the beer market.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Saccharomyces boulardii</i> , yeast, beer, sensory analysis		
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Hanna Koivula, Antti Knaapila, Per Saris		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited University of Helsinki, Digital Theses, E-thesis		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information EKT Series 1929.		

## ESIPUHE

Tämä maisterin tutkielma tehtiin Helsingin yliopistossa, elintarvike- ja ravitsemustieteiden osastolla, elintarviketeknologian pääainesuuntaan. Työn ohjaajina toimivat Hanna Koivula, Antti Knaapila ja Per Saris.

Ennen maisterivaiheen opintojani olut ei ollut ensisijainen tutkimusintressini. Viimeisillä kursseillani professori Marina Heinonen ohjeisti meitä pro gradu -tutkielman aiheenvalinnassa ja kertoi, että yleensä aiheen lähestymiseen on kaksi tapaa. Ensimmäinen on jatkaa kandidaatintutkielman aihetta ja syventyä siihen lisää. Toinen on miettiä täysin uusi aihe, josta vielä haluaa oppia lisää. Koin, että yleissivistykseni oluesta, tuosta yhdestä maailman tärkeimmästä juomasta ei ollut sillä tasolla mitä halusin.

Tutkielman aihetta etsiessä mielessäni pyöri myös suuri kiinnostus terveysvaikutteisia elintarvikkeita kohtaan, joita kandidaatintutkielmani *Nälkä lähtee syödessä? Kylläisyys terveysväitteenä* tutki. Törmätessäni kesällä 2017 Iltalehden artikkeliin *Professori kehitti suolistoystävällisen oluen* tiesin, että tässä on minun aiheeni. Sama alussa syttynyt innostus on kantanut läpi tämän tutkielman teon ja olen iloinen siitä, että hyppäsin tuntemattomaan. Nyt uskallan osallistua keskusteluun kun puhutaan terveysvaikutteisista elintarvikkeista tai jopa oluesta.

Haluan kiittää aistinvaraisen tutkimuksen koulutettuun raatiin osallistuneita ihmisiä työpanoksestanne sekä aistin osuuden ohjaajaani Antti Knaapilaa kurssien myötä saamistani valmiuksista käyttää aistinvaraista menetelmää tutkimuksessani. Kiitos Per Saris siitä, että osaat tartuttaa meihin opiskelijoihin Pelle Pelottoman asenteen, että jokaisessa ideassa voi poikia jotain suurta. Kiitos myös Hanna Koivulalle asiantuntevasta ohjauksesta ja siitä, että ovesi ovat olleet aina avoinna kysymyksilleni.

Suurin kiitos kuuluu kuitenkin perheelleni ja aviopuolisolleni Tonille. Neljä äitiyslomaa opintojen aikana eivät olleet helpoin vaihtoehto, mutta polku, jonka valitsisin yhä uudelleen. Eliel, Linnea, Amos ja Linus annatte merkityksen elämäni ja toivon, että voin osoittaa teille, että Suomessa myös nainen voi saada kaiken; perheen, korkeakoulutuksen ja uran. Olette palauttaneet motivaationi, kun se on ollut kadoksissa ja antaneet syyn jaksaa vaikeidenkin kurssien läpi. Kiitos teille.

Helsingissä maaliskuussa 2020

Anna Liljeroos

# SISÄLLYSLUETTELO

ESIPUHE	4
1 JOHDANTO	6
2 KOKEELLINEN TUTKIMUS	12
2.1 Materiaalit ja menetelmät	12
2.1.1 Tutkimuksen kulku, olutnäytteiden valmistus	12
2.1.2 Raadin rekrytointi ja eettiset näkökohdat	14
2.1.3 Aistinvaraiset arvioinnit, koulutettu raati, yleinen kuvaileva menetelmä	15
2.1.4 Mikrobiologiset mittaukset	19
2.1.5 Teknologiset mittaukset	19
2.1.6 Tulosten käsittely	19
2.2 Tulokset	20
2.2.1 Aistinvarainen arviointi	20
2.2.2 Mikrobiologiset mittaukset	23
2.2.3 Teknologiset mittaukset	23
3 POHDINTA	25
4 PÄÄTELMÄT	28
LÄHDELUETTELO	29
LIITTEET	31
Liite 1. Raadin rekrytointilomake	32
Liite 2. Suostumuslomake aistinvaraiseen tutkimukseen	33
Liite 3. Koulutetun raadin taustatietolomake	34
Liite 4. Sanastonluontilomake kuvailevaan analyysiin	35
Liite 5. HPLC-ajon tulokset näytteistä	36

## 1 JOHDANTO

Olut on yhtä vanha kuin sivistys, toteaa brittiläinen olutasiantuntija Michael Jackson (1998) klassikkoteoksessaan *Suuri olutkirja*. Ei siis ole ihme, että olut pitää edelleen kolmanneksi suosituimman juoman paikkaa maailmassa kahvin ja teen jälkeen ja on alkoholijuomista kaikkein suosituin (Rodhouse ja Carbonero, 2017). Olutta on valmistettu kenties jo kymmentuhatta vuotta sitten ja sen nauttimisesta on löydetty todisteita Mesopotamiasta 4000 eKr. (Kunze 1999).

Viime vuosisatoina oluen tieteellisen historian suurimpiin virstanpylväisiin kuuluu se, kun vuonna 1860 Louis Pasteur todisti fermentoinnin tapahtuvan mikrobien avulla. 1800-luvun tutkijat osoittivat myös hiivan olevan yksisoluisen elävä organismi ja vuonna 1861 keksitty pastörinti vauhditti fermentoinnin avulla valmistettujen elintarvikkeiden ymmärtämistä (Josephsen ja Jespersen 2004). Oluen kehityksen edistysaskelia ovat myös steriilitekniikoiden ja puhtaiden hiivaviljelmien kehittäminen viime vuosisadan alussa. 1970-luvun lopulla opittiin muuntelemaan hiivan genomia ja sen ansiosta biotekniset sovellukset ottivat harppauksen, kun hiivoja voitiin muokata kohdennetusti (Jäntti ym. 2018).

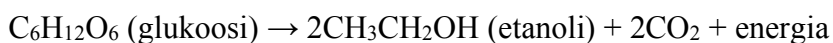
Hiiva on yksi oluen tärkeimmistä raaka-aineista, joihin kuuluu sen lisäksi mallas, humala ja vesi. Tuo pääasiassa vain neljän raaka-aineen juoma on yksinkertaisuudessaan edullinen valmistaa mutta muokattavuutensa ansiosta loputtoman monimuotoinen. Oluelta halutaan erilaisia makuja ja tuoksuja, joihin voidaan vaikuttaa myös valmistuksessa käytetyllä hiivalla (Barth 2013). Mallasjuomat valmistetaan käymisprosessin eli fermentoinnin avulla. Fermentoinnista vastaavia mikro-organismeja ovat hiivat, homeet ja bakteerit (Barth 2013). Maltainä käytetään useimmiten ohraa tai vehnää, mutta myös riisiä tai maissia voidaan käyttää (Kaukinen ym. 1995).

On kuitenkin väliä, mitä hiivaa oluen valmistuksessa käytetään, sillä hiivojen kirjo on erittäin laaja (Dujon 2006). Taksonomisen luokittelun mukaan hiivat ovat yksisoluisia sieninä, kun taas homeiksi kutsutaan sieninä, joilla on nopeaa rihmastokasvua (Jäntti 2018). Sienet ja eläimet taas eroavat kasveista siten, että ne ovat toisvaraisia eliöitä eikä niillä ole kasvien kykyä valmistaa auringonvalosta energiaa. Pitkän yhteisen kehityslinjan vuoksi etenkin yksisoluisista eliöistä on vaikea erottaa kumpaan ryhmään ne tulisi sijoittaa. Sienet kuitenkin eroavat eläimistä puuttuvan sisäisen ruoansulatuksen vuoksi. Sienet erittävät kasvualustansa entsyymejä, jotta pilkotut ravintoaineet imeytyvät sienisolujen sisälle.

Taksonomiassa hiivat jaetaan sukuun, lajiin ja kantaan, joista viimeiselläkin on merkitystä. Timonen (2018) kertoo, että geneettiset erot esimerkiksi *Yarrowia lipolytica* ja leivinhiivan välillä ovat yhtä suuria kuin erot ihmisen ja vaippaeläimiin kuuluvan hyytelömäisen ja läpi-kuultavan meritupen kanssa. Myös *Saccharomyces*-hiivojen ydinryhmän lajit eroavat geneettisesti yhtä paljon kuin vaikkapa kana ja ihminen. Leivinhiivana tunnettu *Saccharomyces cerevisiae* on yksi vanhimmista kohotukseen käytetyistä hiivoista ja leivonnassa se tuo esimerkiksi leipään pehmeän ja kuohkean rakenteen sokerien hajotusprosessissa syntyvän hiilidioksidin ansiosta (Kurtzman ym. 2011).

*S. cerevisiae* on yleisin hiiva, jota käytetään leivän, viinin, oluen ja juuston fermentointiin (Josephsen ja Jespersen 2004). Oluen valmistuksessa *S. cerevisiae*n suosio johtuu sen kyvystä käydä nopeasti huoneenlämmössä, tuottaa fermentoinnissa kuusihiilisistä sokereista korkea etanolisaanto sekä miellyttäviä aromeja (Josephsen ja Jespersen 2004). Hiivoista *S. cerevisiae*n elinkierto tunnetaan parhaiten ja tiedetään, että yhdessä 50 gramman tuorehiivapalassa on yhteensä 500 miljardia hiivasolua (Jäntti ym. 2018).

Hiiva aineenvaihdunnan reaktiotuotteena syntyy kuluttajien arvostama alkoholi, kun hiivat käyttävät ravinnoksi liuoksen sokereita (Barth 2013). Fermentoinnin kemiallinen reaktio, jossa lähtösokerina toimii glukoosi, noudattaa oheisen mukaista kaavaa.



(Barth 2013).

Fermentaatioreaktio ei itsessään tarvitse happea, mutta oluenpanossa alussa hapetetaan viertettä, koska hapen läsnäollessa respiraatio on mahdollinen ja tuottaa paljon enemmän energiaa kuin fermentaatio, mikä mahdollistaa nopeamman kasvun. Näin saadaan nopeasti riittävästi hiivasoluja primäärifermentaation (Barth 2013). Käyminen voidaan jakaa pääkäymiseen ja jälkikäymiseen, joka tapahtuu pullotuksen jälkeen. Pääkäyminen alkaa kun hiiva lisätään vienteeseen. Alkoholikäymisessä hiiva käyttää vierteen käymiskelpoiset sokerit hiilidioksidiksi ja etanoliksi sekä pienissä määrin korkeammiksi alkoholeiksi, orgaanisiksi hapoiksi ja estereiksi. Hiiva tuottaa myös flavoriin vaikuttavia aromiaineita, joista muun muassa estereillä on merkitystä makuun ja aromiin (Kunze 1999).

Hiivoista ja bakteereissa osalla on ihmisten terveyteen vaikuttava ominaisuus. Näitä kutsutaan probiooteiksi, mikä tarkoittaa, että ne ovat ”eläviä mikro-organismeja, jotka riittävästi määrin nautittuna antavat isännälleen terveyshyödyn” (FAO/WHO 2006). Useimmat probiootit ovat maitohappobakteereja, bifidobakteereja ja hiivoja (Patel ja Walker 2004). Näistä tyypillisimmät on esitelty Taulukossa 1. *Bacillus* -bakteereista *B. coagulans* ja *B. subtilis* muodostavat itiöitä ja niitä hyödynnetään rehuissa (Stanton ym. 2003). Probioottien on tarkoituksena on laskea tuotantoeläinten infektioiden määrää (Cutting 2011). Rehun lisäksi *B. subtiliksella* on tärkeä roolin japanilaisen perinneruoan *natto* valmistusprosessissa. Ruoka valmistetaan hapattamalla soijapapuja *B. subtiliksen* avulla (Stanton ym. 2003).

**Taulukko 1.** Probiootteja löytyy laktobasilleista, bifidobakteereista, pallomaisista kokeista, hiivoista ja *Bacillus* -bakteereista joista *B. coagulans* ja *B. subtilis* muodostavat itiöitä (Cutting 2011, Stanton ym. 2003, Patel ja Walker 2004).

Laktobasillit	Bifidobakteerit	Muita
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
<i>L. casei</i> subspecies <i>rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. delbreuckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>
		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
		<i>Pediococcus acidilactici</i>
		<i>Saccharomyces boulardii</i>
		<i>Bacillus coagulans</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>

Probioottien nauttimisella on useita terveysvaikutuksia ihmisille kuten positiivinen vaikutus suoliston mikrobitasapainoon ja ruoat, joissa on probiootteja, voidaan luokitella funktionaaliseksi elintarvikkeiksi (Prado ym. 2008). Yksi keholle hyödyllinen sieni on leivinhoivan sukulainen *Saccharomyces cerevisiae* alalaji *boulardii*. Vaikka *S. boulardiita* on tutkittu kohdallaisesti, sen terveysvaikutuksista on ristiriitaista tietoa (Rijkers ym. 2011).

*S. boulardiin* kantaa CNCM I-745 myydään lääkkeenä. Suomessa vain yhdellä valmistajalla on lääkelupa tuotenimellä Precosa (valmistaja Biocodex Oy). Yksi kapseli Precosaa sisältää 250 mg kylmäkuivattua *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 kantaa. *S. boulardii* -valmisteita on käytetty *Clostridium*- tai antibioottiripulin oireen helpottamiseen, *Clostridium*-



tai antibiootti-ripulin estämiseen ab-kuurin aikana, *Clostridium*-ripulin uusiutumisen estoon ja turistiripulin hoitoon (Flatley ym. 2015).

Precosan käytössä on kuitenkin ilmennyt ongelmia ja se on valmistajan mukaan kielletty potilailta, joilla on keskuslaskimokatetri tai he ovat kriittisesti sairaita tai immuunipuutteisia (Fimea 2018). Precosan käyttöä rajoitettiin ja varoituksia lisättiin kun vuonna 2017 selvitettiin tapauksia, joissa potilailla oli veriviljelyssä kasvanut *Saccharomyces*, ja jotka olivat veriviljelyä edeltävästi saaneet *S. boulardii* -lääkevalmistetta (Karonen ym. 2018). Fimea pyysi lisätietoja keskus- ja yliopistosairaaloista ja sai kevään 2017 aikana kaikkiaan 11 ilmoitusta *Saccharomyces* -viljelypositiivisista fungemioista vaikeasti sairailta tai immuunipuutteisilla potilailla, jotka olivat saaneet *S. boulardii* -lääkevalmistetta. Fungemia on johtanut useissa tapauksissa septiseen sokkiin ja potilaan kuolemaan (Karonen ym. 2018).

Edellisestä huolimatta, elintarviketeollisuudessa probioottisten maitohappobakteerien ja hiivojen käyttöä on sovellettu oluen lisäksi esimerkiksi suklaaseen (Possemiers ym. 2010). Tietoisuus ruoan vaikutuksesta terveyteen on lisääntynyt ja sen myötä kiinnostus probiootteja sisältävään ruokaan kohtaan on kasvanut (Patel ja Walker 2004). Japanissa standardina probioottituotteelle pidetään sitä, että tuote sisältää enemmän kuin  $1 \times 10^7$  elävää *Bifidobacteria* per gramma tai millilitra tuotetta (Ishibashi ja Shimamura 1993). Terveysvaikutteisten elintarvikkeiden markkinoiminen terveyttä edistävinä on kuitenkin vaikeaa. Rijkersin ym. (2011) kuvaavat sitä ongelmaksi todetun tieteen ja lainsäädännön välillä. Probiootin määritelmä itsessään kertoo, että riittävästi nautittuna se parantaa ihmisen terveyttä, mutta lainsäädännön mukaan elintarvikkeesta ei saa esittää lääkkeellisiä väittämiä (EY N:o 1924/2006).

Oluen aistittavaa profiilia voidaan muokata raaka-aineilla, kuten hiivoilla. Hiivojen yhdistäminen on mahdollista ja näin voidaan saada sekä hyvät tekniset että aistinvaraiset ominaisuudet. Hiivojen yhdistämistä ja toimintaa oluessa on tutkittu Nathanail ja Gibsonin tutkimusryhmässä mutta tutkimus keskittyi *Saccharomyces pastorianus* -hiivaan ja sen kykyyn fermentoida maltotriooseja (Nathanail ym. 2016). Dordevic ym. (2016) ovat tutkineet terveysvaikutteisten tuotteiden lisäämistä olueen lisäämällä siihen lääkekasveja ja yrttiuutteita.

*S. boulardii*in käytöstä oluen valmistuksessa ei löydy vielä paljon julkaisuja. Idea ei kuitenkaan ole täysin tuntematon, sillä olutharrastajien kotisivuilla ja blogeissa on muutamia mai-

nintoja olutkokeiluista *S. boulardiilla* mutta yhtään tieteellistä julkaisua ei löydy oluesta ai-noastaan *S. boulardiilla* valmistettuna. Capecen ym. (2018) mielenkiintoisessa tutkimuk- sessa käytettiin hiivahybridiä, *S. cerevisiaen* ja *S. boulardiin* yhdistelmää startterina ja tut- kimuksen tuloksena oli, että *S. boulardii* säilyi oluen valmistuksessa elinkelpoisena eikä *S. boulardiilla* ollut negatiivisia vaikutuksia oluen makuun. Tutkimuksessa tuotetta pidettiin potentiaalisena lähteenä probiooteille mutta todettiin että lisätutkimusta tarvitaan vielä.

Lisäksi Suomessa tuotiin markkinoille helmikuussa 2018 tuusulalaisen Cool Head Brew:n panemaa ”Gut to be good” olutta, joka oli pantu *S. boulardiilla* ja *Lactobacillus rhamnosus* GG:llä, ollen maailman ensimmäinen tuplaprobioottiolut. Tuote kehitettiin ensin Helsingin yliopistolla ja panimossa siihen lisättiin *S. cerevisiae* US-SFALE 04 (suullinen tiedonanto, Per Saris ja Olli Mikkonen). *S. boulardiita* sisältävää olutta on kehitetty myös Espanjassa, jossa sille on myönnetty patentti. Kaakkois-Espanjalaisen Murcian yliopiston hakema pa- tentti (patenttinumero ES2583178) *S. boulardiilla* valmistetulle oluelle on voimassa vain Espanjassa (OEPM 2020).

Kühlen ryhmä oli eristänyt *S. boulardii*- hiivakannan länsiafrikkalaisesta durraoluesta, mutta tutkimus koski hiivojen tarttuvuutta suoliston pintaan (van der Aa Kühle ym. 2005). Oluen valmistuksesta syntyvien hiivasivuvirtojen hyödyntämistä probiootteina on tutkittu hiljattain Argentiinassa (Sampaolesi ym. 2019). *S. boulardiin* hyödyntäminen on herättänyt kiinnostusta kuitenkin myös muissa elintarvikkeissa ja Swiecan ym. (2019) kokeessa sitä lisättiin linsseihin ja adsukipapuihin, jotta niiden versoissa olisi probioottihiivaa. Tutkimuk- sen tuloksena oli, että hiiva pystyi selviytymään kasvissa ja sitä pidettiin potentiaalisena ter- veysruokana. Elintarvikesovelluksia, joissa hiivaa voidaan hyödyntää on paljon, mutta eri- tyisesti puhuttaessa oluesta avautuu valtavat mahdollisuudet.

*S. boulardiin* terveyshyödyistä on tuhansia tieteellisiä julkaisuja. Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea on hyväksynyt *S. boulardii* –hiivaan perustuvan Precosan lääkeval- misteeksi. Funktionaalisena elintarvikkeena olut on ideaali pohja, sillä juoma on edullinen valmistaa mutta muokattavuutensa ansiosta loputtoman monimuotoinen. Oluelta halutaan erilaisia makuja ja tuoksua (Barth 2013). Oluen aistiprofiilin monimuotoisuuden lisäksi ha- lutaan terveyttä edistäviä ainesosia ja sitä, että juoma sopii omiin arvoihin. Tiedostava ku- luttaminen ja terveyden huomioiminen näkyy trendinä myös panimoteollisuuden tuotekehi- tyksessä.

Tutkielman tavoitteena oli selvittää eroaako *Saccharomyces boulardii* -hiivalla valmistettu olut samalla reseptillä, mutta perinteisellä oluthiivalla *Saccharomyces cerevisiaella* valmistetusta oluesta, käyttäen aistinvaraisen tutkimuksen kuvailevaa menetelmää. Tutkimuksessa selvitettiin olutnäytteiden keskeisimpien ominaisuuksien aistiprofiili, sekä suurimmat tuotteita erottelevat tekijät. Referenssinä toimi samankaltaisilla raaka-aineilla valmistettu kaupallinen olut. Aistinvaraisen tutkimuksen lisäksi haluttiin selvittää probioottihiivalla valmistetun oluen teknologia ja mikrobiologisia ominaisuuksia.

Tutkimuskysymyksiä olivat:

- Eroaako probioottihiivalla valmistettu olut perinteisestä oluesta aistinvaraisilta ominaisuuksiltaan?
- Säilyykö hiiva elinkelpoisena oluessa ensimmäisten kuukausien aikana?
- Miten käymislämpötila ja käytetty hiiva vaikuttavat oluen aistiprofiiliin, tuotteen alkoholipitoisuuteen, happamuuteen (pH) sekä väriin?

## 2 KOKEELLINEN TUTKIMUS

Aistinvarainen tutkimus suoritettiin koulutetulla raadilla yleistä kuvailevaa analyysiä käyttäen. Koeasetelmassa oli viisi eri näytettä, joista kolme oli valmistettu *S. cerevisiae* hiivalla ja kaksi *S. boulardii* hiivalla. Toinen muuttuja hiivojen lisäksi oli lämpötila. Kolme näytteistä oli käynyt 20 asteen lämpötilassa ja kaksi 37 asteen lämpötilassa. Aistitettavia ominaisuuksia (haju, ulkonäkö, rakenne, maku) tutkittiin kuvailevalla analyysillä ja tuloksista tehtiin graafinen tähtikuvio, jonka avulla voidaan havainnollistaa oliko näytteiden välillä tilastollisesti merkittävää eroa eri ominaisuuksissa.

Mikrobiologisissa mittauksissa tutkittiin *S. boulardii* hiivalla valmistetun oluen probioottipitoisuus ja hiivan määrän muutos ajan kuluessa. Maljaukset tehtiin yhden, kahden ja kolmen kuukauden kohdalla valmistuksesta. Teknologisista ominaisuuksista mitattiin alkoholi-pitoisuus, pH ja väri.

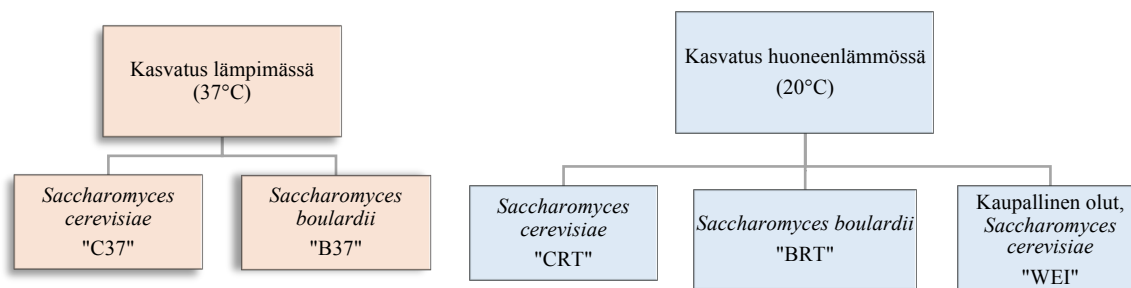
### 2.1 Materiaalit ja menetelmät

Tutkimuksen olutnäytteistä neljä olutnäytettä valmistettiin itse ja viidenneksi ostettiin suosittu kaupallinen olut, jota on saatavilla kansainvälisillä markkinoilla. Valitun kaupallisen oluen oli tarkoitus tuoda vertailukohtaa kaupallisista tuotteista ja olut valittiin vastaamaan raaka-aineiltaan ja valmistustekniikaltaan itsevalmistettuja näytteitä, jotta se kuvastaisi itsevalmistetun oluen mahdollista kaupallista potentiaalia samassa tuotekategoriassa. Tutkimusmenetelmäksi valittiin aistinvarainen tutkimus koulutetulla raadilla, sillä se kertoo näytteitä erottelevista tekijöistä, ulkonäön, hajun, maun ja suutuntuman mukaan. Tässä tutkimuksessa ei vielä keskitytty tuotteen miellyttävyyteen, sillä oli tärkeää saada tietoa tuotteen perusominaisuuksista, jotta reseptiä voisi kehittää siitä eteenpäin.

#### 2.1.1 Tutkimuksen kulku, olutnäytteiden valmistus

Olutnäytteinä oli itse tehty vehnäolut, jota valmistettiin kahdella eri hiivalla, *S. cerevisiae*ella ja *S. boulardi*illa sekä perinteinen kaupallinen vehnäolut (Weihenstephaner, Hefe Weissbier, parasta ennen 19.12.2018). Olutnäytteet on havainnollistettu Kuvassa 1. Maltaina oli 3 kg vehnämaltaita ja 3 kg Pilsner-ohramallasta. Olut valmistettiin tunnin keitto-ohjelmalla. Olutta laitettiin käymään kahteen eri lämpötilaan (20 °C ja 37 °C). Tutkimuksessa käytetty olut valmistettiin Helsingin yliopistolla 12.2.2018. Näytteistä ”C37” eli perinteisellä

*S. cerevisiaella*, lämpimässä käynyt näyte jätettiin pois aistinvaraisesta arvioinnista, sillä se ei täyttänyt aistinvaraisen tutkimuksen laatuvaatimuksia. Näytteestä tehtiin kuitenkin muut teknologiset mittaukset eli alkoholipitoisuus, pH ja väri.



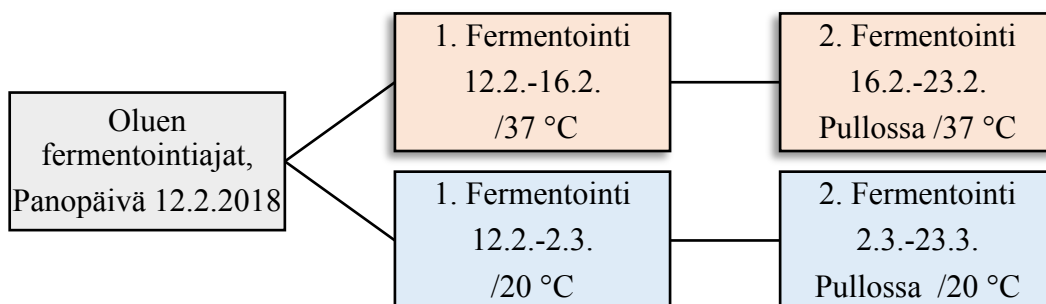
**Kuva 1.** Kaavio näytteistä, joista ei-kaupalliset valmistettiin itse. Samankaltainen suodattamaton vehnäolut Weihenstephaner Hefe Weissbier ”WEI” ostettiin referenssiksi. Kaaviossa näkyy tuotteista tuloksissa käytetyt lyhenteet.

Olut humaloitiin kevyesti, sillä tutkimuksessa ei haluttu arvioida katkeron määrää, humaloinnista tulevaa sävyä tai sitä, että humalan katkerot hallitsisivat makua. Tarkoitus oli, että kevyen humaloinnin ansioista oluen perusraaka-aineet: mallas, humala, hiiva ja vesi tulevat kaikki tasapainoisesti esiin. Vierteeseen lisättiin 20 g molempia humalia Humlegårdens ekolager (Magnum pellets, pussikoko 100 g, 11,0 % Alfasyra, Tyskland 2016. Parasta ennen 30.6.2019. Pussinnumero 410606) sekä Humala First Gold (Luomu, UK, pelletti, pussikoko 250 g. Parasta ennen 13.6.2019). Lopullinen saanti olutta oli erästä yksi 24,5 litraa ja erästä kaksi 21,7 litraa.

Olutpohja valmistettiin kahdessa eri astiassa oluen valmistuskaluston koon vuoksi mutta lopuksi erät yksi ja kaksi sekoitettiin. Tämän jälkeen ne jaettiin uudelleen kahteen astiaan, jotta vierrepohja oli kaikissa näytteissä homogeeninen. Kun keitto loppui, olutta käsiteltiin huolehtien antiseptisistä toimintatavoista. Vierreastiaan lisättiin villihiivojen kasvua estämään 15 ml Star San HB desinfiointiainetta (Five Star Chemicals & Supply Inc. Parasta ennen 27.6.2022. Belgium.).

Kun hiiva lisättiin, vierteen lämpötila oli 17,8°C, huoneenlämpötilan ollessa 20,3°C. Precosa (kylmäkuivattu *S. boulardii* CNCM I-745) oli liotettu kasvuliemeen. Kasvulientä lisättiin 250 ml. Perinteinen oluthiiva (*S. cerevisiae* US-SFALE 04), oli myös kasvuliemessä ja kasvulientä lisättiin sama 250 ml, vierteen ollessa 17,8°C ja huoneenlämpötilan ollessa 22,4°C. Huoneenlämmössä fermentoitavat näytteet jätettiin valmistushuoneeseen käymään.

Lämpimässä fermentoitavat näytteet lämmitettiin 37 asteeseen ennen hiivan lisäämistä ja vietiin sen jälkeen lämpöhuoneeseen. Pullotus tehtiin ruskeisiin lasipulloihin ja pullot suljettiin kruunukorkeilla. Fermentointiajat on nähtävillä Kuvassa 2. Pullotuksen jälkeen näytteet säilytettiin jääkaapissa (4 °C).



**Kuva 2.** Oluen valmistuspäivä ja näytteiden fermentointiajat. Pullotus tehtiin tummiin pulloihin ja ne suljettiin kruunukorkeilla.

### 2.1.2 Raadin rekrytointi ja eettiset näkökohdat

Aistinvaraista tutkimusta varten rekrytoitiin raati, jonka tavoitteeksi asetettiin kaksitoista osallistujaa. Raati (n = 9) saatiin kokoon mainostamalla tutkimusta alan opiskelijoille (raadin rekrytointilomake, Liite 1) ja ilmoittautumiset kerättiin e-lomakkeella. Raatilaisten ikäjakama oli 21–33 vuotta ja heistä seitsemän oli yliopiston opiskelijoita, yksi henkilökuntaa ja yksi muu henkilö. Kaikki raatilaisten olivat taustatietolomakkeen (Liite 2) mukaan osallistuneet joskus aikaisemmin aistinvaraiseen tutkimukseen. Viisi raatilaista oli osallistunut sekä koulutetun raadin tutkimukseen että kuluttajatutkimukseen. Yksi raatilainen oli osallistunut vain koulutetun raadin tutkimukseen ja kolme oli osallistunut aiemmin vain kuluttajatutkimukseen. Raatilaisten ei tarvinut olla tottuneita oluen käyttäjiä mutta seitsemän heistä nautti olutta kuukausittain.

Kysyttäessä kuinka usein valitset vehnäoluen nauttiessasi olutta, kolme vastasi usein, viisi vastasi joskus ja yksi vastasi harvoin. Rekrytointilomakkeen mukaan osallistuvilta ei edellytetty aiempaa kokemusta aistinvaraisesta arvioinnista, vaan ainoastaan täysi-ikäisyyttä ja sitoutumista koulutuksiin ja arviointitilaisuuksiin. Tutkimuksen suostumuslomakkeessa (Liite 3) muistutettiin, että arvioitavana on mietoja alkoholijuomia, jotka voivat vaikuttaa kykyyn ajaa autoa, operoida työkoneita tai suorittaa tarkkuutta vaativia tehtäviä. Olutnäytteitä ei missään kokeen vaiheessa tarvinnut niellä.

Aistivaraisten tutkimuksen toteutuksessa huomioitiin ihmiskokeita käsittelevät eettiset ohjeet. Tulokset käsiteltiin luottamuksellisesti niin, että osallistuneet koehenkilöt olivat testissä ja tuloksissa koenumeroilla edustettuina, sillä on tärkeää, että yksittäisen koehenkilön tuloksia ei voida tunnistaa (Miettinen ja Tuorila 2016). Osallistujia pyydettiin täyttämään suostumuskaavake ja heitä informoitiin myös tutkimuksessa käytettävien elintarvikkeiden allergeeneistä: vehnä, gluteeni ja hiiva.

Tieteen kentässä aistinvarainen tutkimus asettuu ei-lääketieteellisen ihmistutkimuksen alaan, jolloin sitä ei säätele laki (Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta n:o 488/1999). Tämä selittyy sillä, että aistinvaraisen tutkimuksen kohteena on usein terveet ihmiset ja normaalit elintarvikkeet eikä tutkimusasetelma ole niin monimutkainen kuin lääketieteellisissä tutkimuksissa voi olla (Miettinen ja Tuorila, 2016). Lainsäädännön puutteesta huolimatta tutkimuksessa noudettiin hyvän tieteellisen käytännön periaatteita (engl. good scientific practice).

### **2.1.3 Aistinvaraiset arvioinnit, koulutettu raati, yleinen kuvaileva menetelmä**

Kuvailevaa analyysiä varten näytteitä säilytettiin tarvittava määrä aistilaboratorion jääkaapissa. Raadin koulutuksissa näytteitä arvioitiin laseista ja varsinaisissa arvioinneissa näytteet kaadettiin kirkkaisiin muoviasioihin. Näytteet kaadettiin vasta kun arvioijat olivat valmiina, jolloin näyte pysyi kylmänä tarjoiluun asti. Raadin koulutuksissa suun neutralointia varten oli tarjolla maissinaksuja sekä vesilasi kuten Kuvassa 3 esitetään.



**Kuva 3.** Tarjotin menossa raadin koulutustilaisuuteen. Taustalla pullot joista olutnäytteet kaadettiin. Näytteet olivat satunnaistettu, eikä näytteistä kerrottu raatilaisille ennakkotietoa. Pahvimuki oli näytteiden sylkemistä varten ja vesilasi sekä maissinaksut suun neutralointia varten.

Koulutuskertoja järjestettiin kolme ja kaikki raatilaiset osallistuivat kahteen koulutukseen. Kolmas koulutustilaisuus oli vaihtoehtoinen tilaisuus muutamalle henkilölle, jotka eivät olleet aikataulusyistä päässeet toiseen koulutustilaisuuteen. Koulutustilaisuuksiin oli varattu 1,5 tuntia aikaa. Raadin kouluttajana toimi tutkimuksen tekijä.

Ensimmäisellä koulutuskerralla raatilaiset saivat eteensä kolme erilaista olutnäytettä ja heidän tehtävänään oli tutustua näytteisiin ensin katselemalla, haistamalla ja sitten maistamalla. Raatilaisia pyydettiin kuvailemaan sanastonluontilomakkeelle (Liite 4) näytteiden ulkonäköä, hajua (aromia), suutuntumaa ja makua/flavoria mahdollisimman monella sanalla. Raatilaisia pyydettiin kiinnittämään huomiota tuotteita erotteleviin tekijöihin, käyttämättä mielitymystä kuvaavia sanoja, kuten ”hyvä” tai ”epämiellyttävä”. Usein toistuvista sanoista koottiin yhteisen keskustelun perusteella kahdeksan tärkeintä tuotetta kuvailevaa ja erottelevaa sanaa, joiden merkityksen kaikki ymmärsivät samalla tavalla.

Toisessa koulutustilaisuudessa raatilaiset asettivat näille sanoille arviointiasteikon ja ankkurit. Raati päättyi päistä ankuroituun jana-asteikkoon (0-10). Jokainen ominaisuus skaalattiin asteikolle, niin että tuotteiden erot tulisivat esille eli voimakkuus arvioitiin suhteessa toisiin näytteisiin. Raati oli koulutusten aikana hyvin keskusteleva ja tunnelma koulutuksissa pysyi



pääosin yksimielisenä. Arviointeja varten näytteet satunnaistettiin (Kuva 4). Näytteiden satunnaistus ja arviointi suoritettiin aistilaboratoriossa FIZZ-ohjelmalla, versio 2.51 (Biosystemes, Couternon, France).



**Kuva 4.** Näytteiden satunnaistaminen arviointitilaisuutta varten Viikin aistilaboratoriossa EE-talossa. Olut kaadettiin astioihin kylmänä kun arvioija oli tullut paikalle.

Raati valitsi arvioitavaksi kahdeksan tuotetta erottelevaa ominaisuutta. Lopulliseen arvioinneissa käytettävään sanastoon ei valittu päällekkäisiä tai toistensa vastakohtaa tarkoittavia sanoja. Huomioitavaa oli, että raati päätyi ominaisuuteen ”makeus” hajuna.



**Kuva 5.** Näytteet tarjottimella menossa arviointikoppiin. Tarjottimella oli satunnaistetut olutnäytteet sekä vesilasi. Arviointikopeissa oli allas ja vesipiste, jonne näytteet pystyi sylkemään.

Arviointiin valittu sanasto ja ominaisuuksien luokittelu ulkonäköä, hajua, suutuntumaa ja makua kuvaaviin sanoihin on esitetty Taulukossa 2. Arvioitavat ominaisuudet asetettiin järjestykseen, jota käytettiin arvioinneissa sen mukaan, että ulkonäkö ja haju arvioitiin ennen kuin näytteitä maistettiin. Näytteet tarjoiltiin läpinäkyvistä muoviastioista (Kuva 5). Arviointitilaisuuteen raatilaiset saivat tulla sovitussa aikaikkunassa oman aikataulunsa mukaan. Raatilaisia pyydettiin varaamaan arviointiin 30 minuuttia aikaa.

**Taulukko 2.** Neljä ominaisuutta kuvasivat olutnäytteiden flavioria, kaksi ulkonäköä, yksi suutuntumaa ja yksi hajua. Vaahtoutuvuus arvioitiin pyöräyttämällä näyteastiaa kevyesti.

Ominaisuuden luokittelu	Arvioitava ominaisuus
Ulkonäköä kuvaava sana	Vaahtoutuvuus
Ulkonäköä kuvaava sana	Sameus
Hajua kuvaava sana	Makeus
Suutuntumaa kuvaava sana	Hiilihappoisuus
Flavoria kuvaava sana	Tunkkaisuus
Flavoria kuvaava sana	Hiivaisuus
Flavoria kuvaava sana	Happamuus
Jälkimakua kuvaava sana	Jälkimaun voimakkuus

### 2.1.4 Mikrobiologiset mittaukset

Mikrobiologiset mittaukset tehtiin mikrobiologian osaston tiloissa Biokeskuksessa. Näytteitä säilytettiin fermentoinnin jälkeen kylmähuoneessa, jonka lämpötila oli 4 °C. Näytteistä valmistettiin laimennossarja, jossa Ringer-liuosta oli 4,5 ml ja näytettä 0,5 ml. Hiivan kasvua seuraavat maljaukset tehtiin ainostaan *S. boulardii* näytteistä (RT ja 37), sillä kiinnostuksen kohteena oli juuri probioottihiivan säilyvyys oluessa. Maljauksia tehtiin kolme rinnakkaista vahvuuksista ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ), tulosten luottavuuden parantamiseksi sekä virhemarginaalin pienentämiseksi esimerkiksi pipetointivirheen vuoksi. Siirrostuksia mallasagar-maljoille oli yhdeksän molemmista näytteistä (BRT ja B37). Maljaukset tehtiin 1, 2 ja 3 kuukauden kohdalla oluen valmistuksesta. Inkubointi tapahtui huoneenlämmössä (20 °C). Pesäkkeitä muodostavat yksiköt laskettiin aina kolmentena inkubointipäivänä.

### 2.1.5 Teknologiset mittaukset

Teknologisista ominaisuuksista mitattiin alkoholipitoisuus, pH ja väri. Alkoholipitoisuus mitattiin käyttäen korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa, HPLC (engl. High Performance Liquid Chromatography). Mittaus tehtiin täysin automatisoidulla Hewlett Packard HP1047A laitteella. Olutnäytteet suodatettiin ja laimennettiin 1:1, 5 mM rikkihapolla ( $H_2SO_4$ ). Kromatogrammipiikeistä luettiin etanolimäärä ja kerrottiin kahdella laimennoksen vuoksi. Samasta ajosta voitiin lukea myös maltoosin määrä, joka osoittautui tuloksissa mielenkiintoiseksi vaikka sokereiden määrää ei kokonaisuudessa ollut tarkoitus tutkia.

pH mitattiin Mettler-Toledo Seven Easy laitteella (KEMBI 13728 HU 2009). Mittaus suoritettiin samoista näytteistä, joista tehtiin värisävyyn määrittäminen Tikkurilan Symphony OPUS II värivihkua apuna käyttäen. Väri arvioitiin valkoista taustaa vasten laboratorihuoneessa hyvässä valaistuksessa.

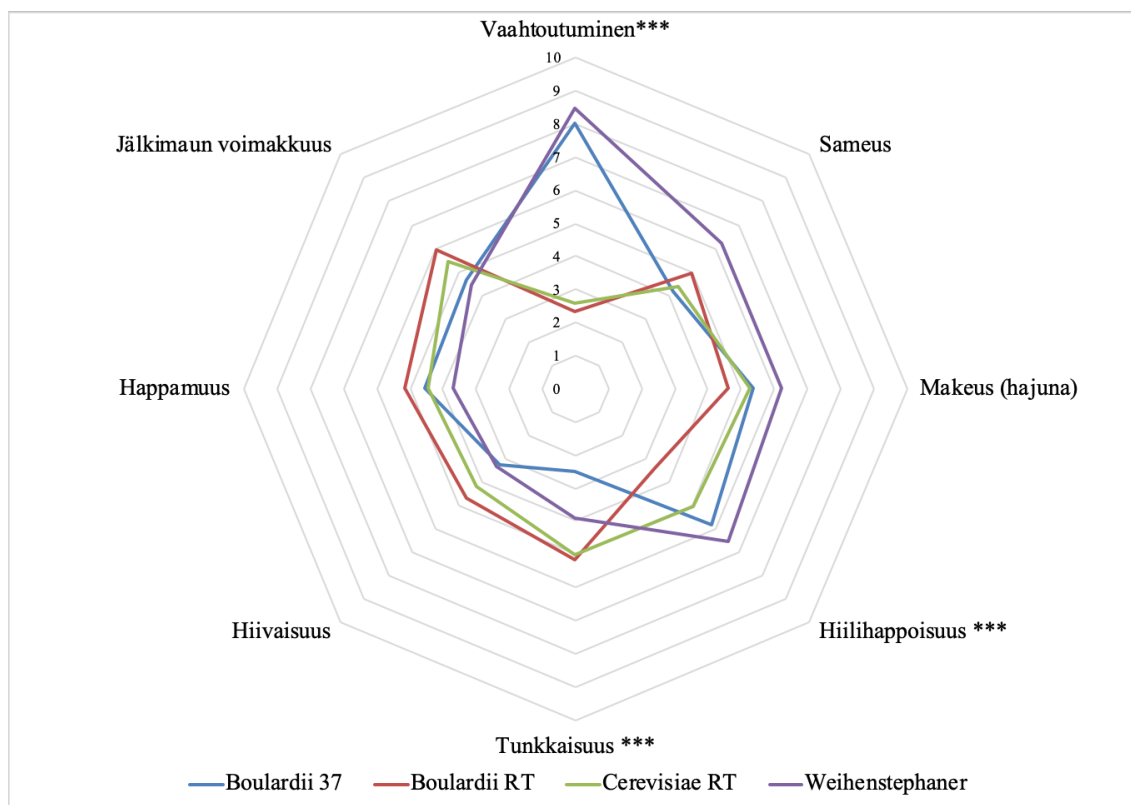
### 2.1.6 Tulosten käsittely

Tuloksista laadituista taulukoista ja kuvaajista voidaan arvioida onko näytteiden teknologisia ominaisuuksilla ollut yhtäläisyyttä aistiprofiiliista löytyviin eroihin tai samankaltaisuuksiin. Olutnäytteiden aistinvaraisia eroja tarkasteltiin käyttämällä varianssianalyysiä (one-way ANOVA) ja tuloksista piirrettiin graafinen tähtikuvio. Tukeyn testillä havainnollistettiin, mitkä näytteet olivat samankaltaisia toisiinsa nähden.

## 2.2 Tulokset

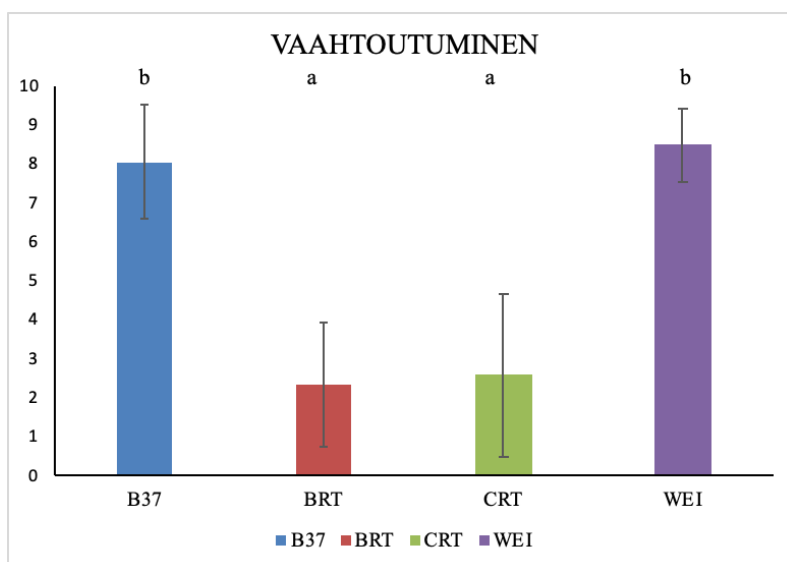
### 2.2.1 Aistinvarainen arviointi

Koulutetun raadin arvioinneista ( $n = 9$  ja 2 toistoa eli 18 arviointia) selviää, että tilastollisesti merkittävää eroa näytteiden välillä oli kolmella ominaisuudella: vaahtoutumisella, hiilihappoisuudella sekä tunkkaisuudella (Kuva 7). Mielenkiintoista on myös se, että kaupallinen olut Weihenstephner ja *S. bouldardii* 37 olivat hyvin samankaltaisia. Molemmat näytteet olivat vaahtoavia sekä kuplivia, ja niistä pystyi suutuntumalla aistimaan hiilihappoisuuden. Huoneenlämmössä käyneet näytteet BRT ja CRT olivat muuten samankaltaisia mutta ”läs-sähtäneeksi” kuvattu BRT ei ollut yhtä hiilihappoinen kuin CRT. Huomioitavaa on, että vaikka kyse käytetyn hiivan erojen tutkimisesta, ei aistiprofilissa tullut tilastollisesti merkittävää eroa hiivaisuuden maussa näytteiden välillä.



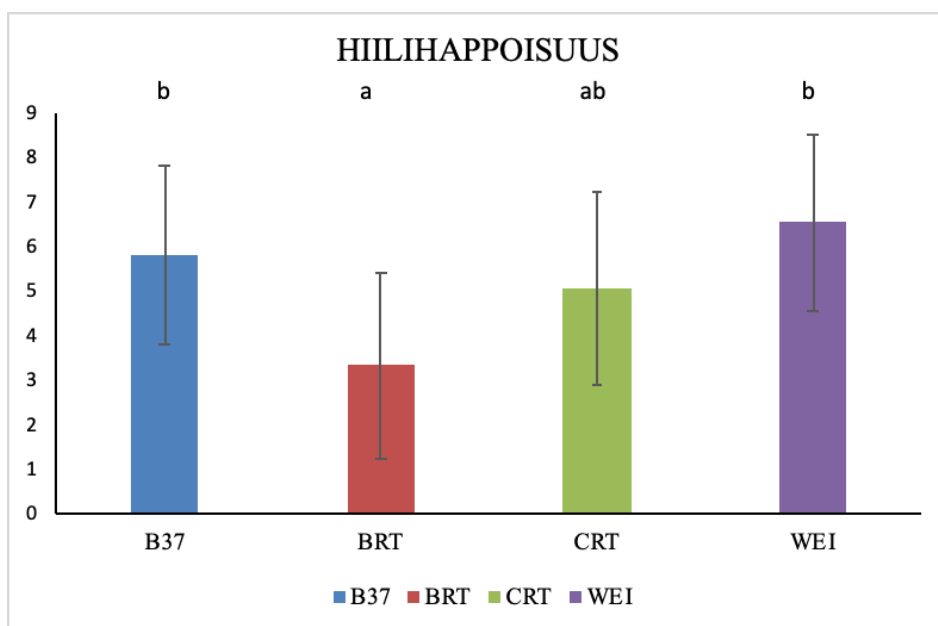
**Kuva 7.** Ominaisuuksien merkittävyys (\*:  $p_{hav} \leq 0,05$ ; \*\*:  $p_{hav} \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p_{hav} \leq 0,001$ ). Tilastollisesti merkittävää eroa näytteiden välillä oli vaahtoutumisessa, hiilihappoisuudessa sekä tunkkaisuudessa.

Yksisuuntaisen ANOVAN ja Tukeyn testin mukaan näytteet voidaan kategorisoida luokkiin, joissa eri luokkien keskiarvot eroavat tilastollisesti. Kuvassa 8 nähdään, että B37 ja WEI ovat merkitty kirjaimella b, joten ne eivät eroa tilastollisesti toisistaan. Kirjaimella a merkityt näytteet BRT ja CRT eivät myöskään eronneet tilastollisesti toisistaan.



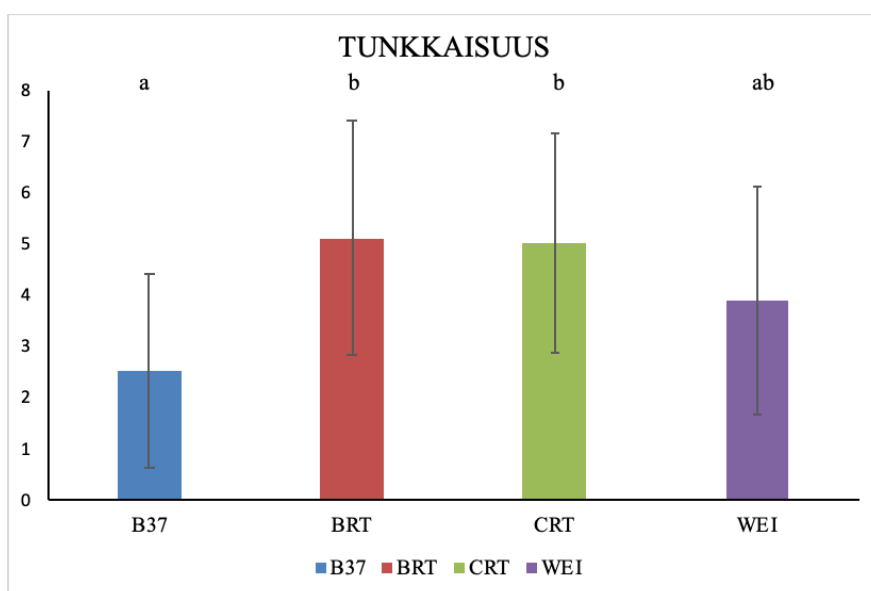
**Kuva 8.** Vaahtoutumisessa oli eroja a ja b -kategoriaan luokitelluiden näytteiden välillä. B37 ja WEI olivat vaahtoavia mutta BRT ja CRT eivät vaahtonneet. Näytteiden lyhenteet: B37= *S. boulardii* valmistuslämpötila 37 °C, BRT= *S. boulardii* valmistuslämpötila huoneenlämpö, CRT= *S. cerevisiae* valmistuslämpötila huoneenlämpö, WEI= Weihenstephaner.

Hiilihappoisuutta arvioitiin suutuntumana ja BRT, joka ei kuplinut lainkaan avatessa eikä ollut vaahtoinen, ei ollut myöskään hiilihappoinen. Sen sijaan CRT kategorisoitui näytteiden välille (Kuva 9). B37 ja WEI arvioitiin selkeästi hiilihappoisiksi. Huomattavaa on, että kun kaupallinen WEI olutpullo avattiin se sihahti ja kuohui kaadettaessa lasiin. Näytteen B37 kohdalla törmättiin tekniseen ongelmaan. Olut kuohui voimakkaasti pulloa aukaistaessa, jopa niin että nestettä meni hukkaan huomattavan suuri määrä. Myös näytteen alkoholipitoisuus oli jäänyt hyvin matalaksi. HPLC tuloksista, jotka tehtiin alkoholipitoisuuden määrittämistä varten, oli luettavissa korkea maltoosipitoisuus, joten olueen oli jäänyt paljon sokeria ja sinne oli kehittynyt paljon hiilidioksidia. Pulloa avattaessa hiilidioksidi vapautui ja aiheutti oluen voimakkaan kuohumisen.



**Kuva 9.** Näytteet WEI ja B37 olivat suutuntumaltaan hiilihappoisia kun taas BRT ei ollut. Näyte CRT muistutti sekä hiilihappoisia näytteitä kuin näytettä BRT, joka ei ollut hiilihappoinen. Näytteiden lyhenteet: B37= *S. boulardii* valmistuslämpötila 37 °C, BRT= *S. boulardii* valmistuslämpötila huoneenlämpö, CRT= *S. cerevisiae* valmistuslämpötila huoneenlämpö, WEI= Weihenstephaner.

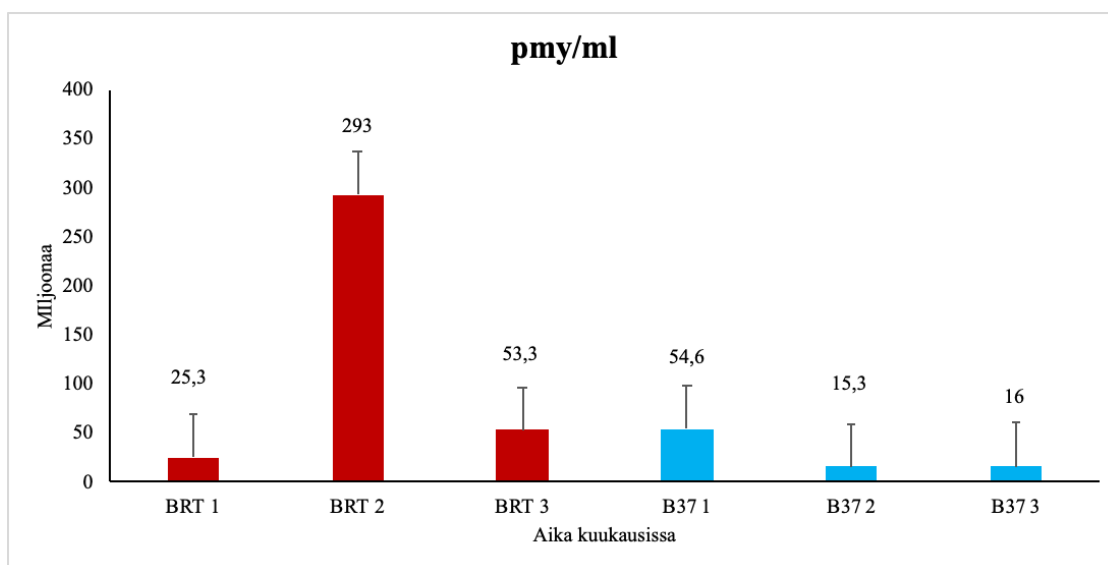
Tilastollisesti merkittävää eroa oli myös tunkkaisuudessa, jota löytyi eniten näytteistä joissa oli korkein alkoholipitoisuus. Maultaan tunkkaisimmat näytteet BRT ja CRT (Kuvassa 10) olivat myöskin väriltään tummempia kuin WEI ja B37. Tunkkaiset näytteet olivat myös samoja, joissa oli tilastollisesti vain vähän hiilihappoisuutta.



**Kuva 10.** Tunkkaisuus oli havaittavissa huoneenlämmössä käyneissä näytteissä BRT, CRT ja WEI. Lämpimässä käynyt B37 näyte ei ollut yhtä tunkkainen. Kaupallinen olut ei eronnut tilastollisesti kummastakaan ryhmästä. Näytteiden lyhenteet: B37= *S. boulardii* valmistuslämpötila 37 °C, BRT= *S. boulardii* valmistuslämpötila huoneenlämpö, CRT= *S. cerevisiae* valmistuslämpötila huoneenlämpö, WEI= Weihenstephaner.

## 2.2.2 Mikrobiologiset mittaukset

Pesäkkeitä muodostavia yksiköjä löytyi molemmista *S. boulardii* näytteistä koko kolmen kuukauden tutkimusajan. Pienimmilläänkin pmy/ml määrä oli  $1,53 \times 10^7$  (Taulukko 5). Probioottisen ominaisuuden rajana pidetään Ishibashi ja Shimamurin (1993) mukaan  $10^7$  pitoisuutta ja se toteutui kaikissa näytteissä. Hiivan määrä oli suurempi ensimmäisen kuukauden kohdalla lämpimässä käyneessä näytteessä B37 ja toisen ja kolmannen kuukauden kohdalla huoneenlämmössä käyneissä BRT näytteissä (Kuva 11).



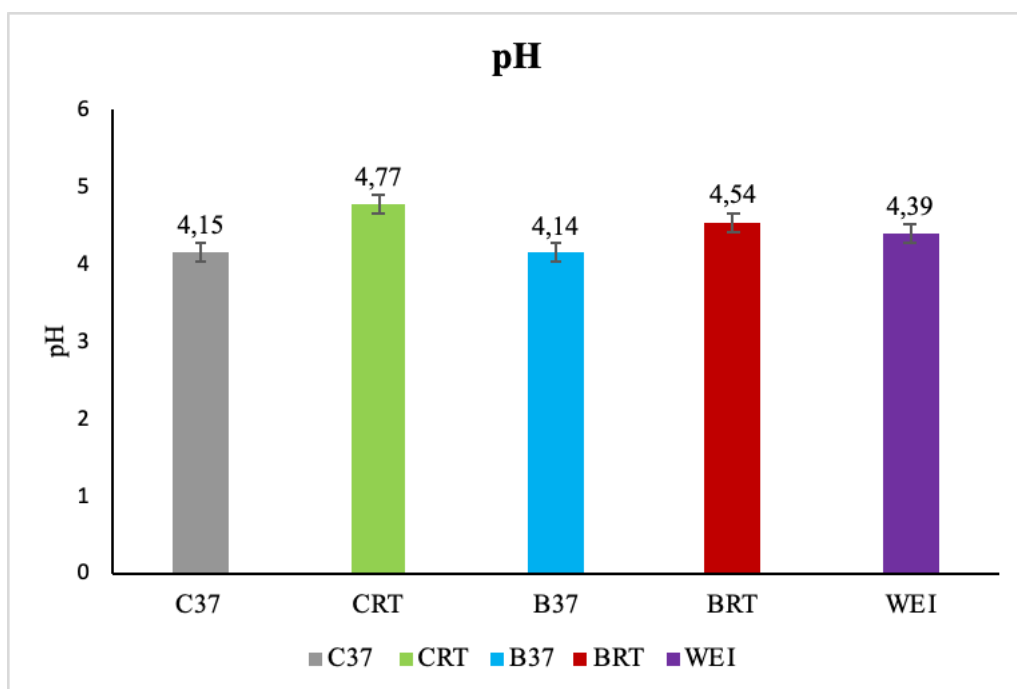
**Kuva 11.** *Saccharomyces boulardii*in säilyminen oluessa ajan funktiona. Näytteiden lyhenteet: BRT= *S. boulardii* valmistuslämpötila huoneenlämpö, B37= *S. boulardii* valmistuslämpötila 37 °C.

**Taulukko 5.** Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä millilitrassa nestettä (pmy/ml).

Näyte/kk	BRT 1kk	BRT 2kk	BRT 3kk	B37 1kk	B37 2kk	B37 3kk
Pmy/ml	$2,53 \times 10^7$	$2,93 \times 10^8$	$5,33 \times 10^7$	$5,46 \times 10^7$	$1,53 \times 10^7$	$1,60 \times 10^7$

## 2.2.3 Teknologiset mittaukset

Näytteiden erot happamuudessa olivat pieniä. Happamimpia olivat lämpimässä käyneet näytteet S37 ja B37 (Kuva 12). Näytteiden lämpötilat mittaushetkellä olivat 17,318,5 °C.



**Kuva 12.** Oluiden pH. Näytteiden lämpötila oli 17,318,5 °C mittaushetkellä. Näytteiden lyhenteet: C37= *S. cerevisiae* valmistuslämpötila 37 °C, CRT= *S. cerevisiae* valmistuslämpötila huoneenlämpö, B37= *S. bouldarii* valmistuslämpötila 37 °C, BRT= *S. bouldarii* valmistuslämpötila huoneenlämpö, WEI= Weihenstephaner

Värisävyn määrittäminen tehtiin sen vuoksi, että sillä saattaisi olla yhteyttä näytteiden aistinvaraisiin ominaisuuksiin, joissa kuvattiin ulkonäköä vaahtoutumisen ja sameuden näkökulmasta. Mielenkiintoista onkin, että sameudessa ei ollut eroa mutta maun puolesta tunkkaisen makuisiksi arvioidut näytteet BRT ja CRT olivat myöskin värisävyiltään tummempia, mikä on havaittavissa Kuvassa 13. Kaupallinen olut WEI oli vaaleimman keltainen ja sitä muistutti eniten B37. Näytteiden värisävyt Tikkurilan Opus II väri viuhkalla ovat Taulukossa 6.



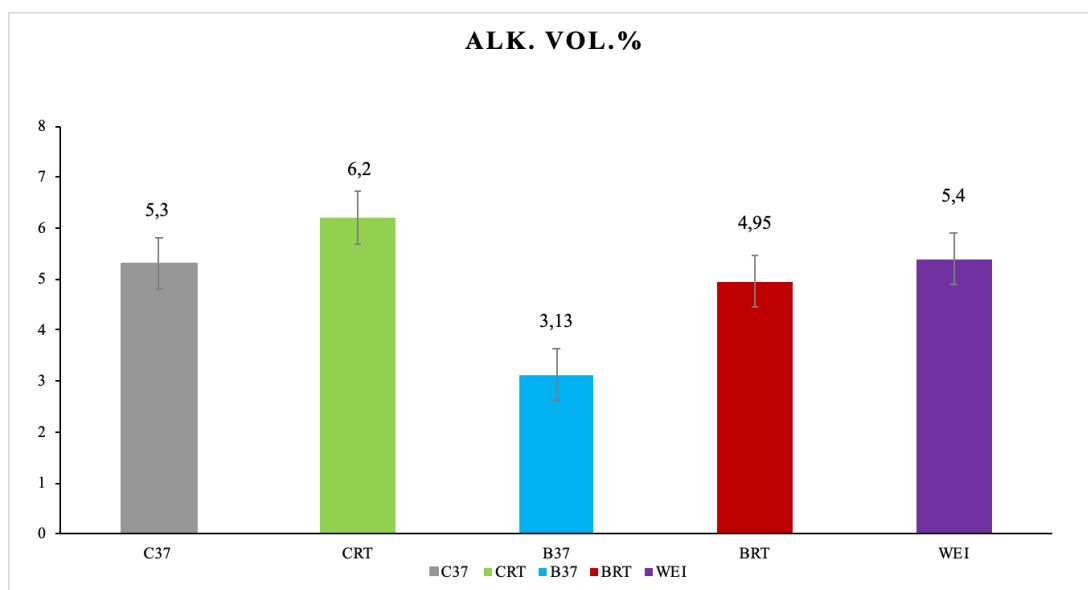
**Kuva 13.** Olutnäytteet vasemmalta: BRT, B37, CRT, C37 ja WEI. Weihenstephaner oli vaaleimman keltainen ja sitä muistutti eniten B37. Huoneenlämmössä käyneet näytteet BRT ja CRT olivat tummempia kuin lämpimässä käyneet itsevalmistetut näytteet. Aistinvaraisessa tutkimuksessa ei ollut eroa sameudessa mutta samat BRT ja CRT arvioitiin maultaan tunkkaisiksi.



**Taulukko 6.** Näytteiden värisävy Tikkurilan Symphony Opus II väriviuhkalla.

	US 37	US RT	B 37	B RT	WEI
Opus II	K398	L398	J395	K396	L397

Näytteiden alkoholipitoisuudessa oli paljon vaihtelua (Kuva 14). Vahvin oli CRT 6,16 alkoholiprosentilla ja sen jälkeen tulivat hyvin tasaisesti S37 ja WEI, joissa oli 5,3–5,4 prosenttia alkoholia. Miedoimmaksi jäi B37, jossa oli alkoholia ainoastaan 3,13%.



**Kuva 14.** Alkoholipitoisuudessa oli paljon vaihtelua. Lämpimässä käynyt B37, ei käyttänyt fermentoinnissa maltoosia, joten sen alkoholipitoisuus jäi matalimmaksi. Kaupallinen WEI ja C37 olivat hyvin lähellä toisiaan alkoholipitoisuudessa. Näytteiden lyhenteet: C37= *S. cerevisiae* valmistuslämpötila 37 °C, CRT= *S. cerevisiae* valmistuslämpötila huoneenlämpö, B37= *S. boulardii* valmistuslämpötila 37 °C, BRT= *S. boulardii* valmistuslämpötila huoneenlämpö, WEI= Weihenstephaner

### 3 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, että eroaako probioottihivalla valmistettu olut perinteisestä oluesta aistinvaraisilta ominaisuuksiltaan. Tutkimustulosten valossa yksi valmistetuista näytteistä, lämpimässä käynyt *S. boulardii* 37 -näyte ei eronnut tilastollisesti lainkaan kaupallisesta oluesta. Näyte oli samantyyppinen kaikilta ominaisuuksiltaan, joita koulutettu raati arvioi. Mikäli ajatellaan, että valittu kaupallinen olut on ideaalinen tuote, sillä se on jo suosittu kuluttajien keskuudessa niin tutkimustuloksia voi pitää hyvin merkittävänä vakuuttamaan myös probioottihivalla valmistetun oluen kaupallista potentiaalia. Huomattavaa on myös se, että probioottihivian käyttö verrattuna perinteiseen oluthiivaan ei aiheutanut hiivaisuuden maun voimakkuudessa tilastollisesti merkittävää eroa. Tuloksista voidaan

kuitenkin päätellä, että käymislämpötilalla oli vaikutusta oluen aistiprofiiliin, joten valmistusprosessi on erittäin tärkeässä asemassa.

Aistinvaraisen tutkimuksen raatilaiset olivat kaikki kokeneita, sillä jokaisella henkilöllä oli aiempaa kokemusta aistinvaraisesta arvioinnista vaikka sitä ei edellytetty rekrytointivaiheessa. Taustatietolomakkeen mukaan myös kaikki raatilaiset tunsivat oluen ja nauttivat sitä usein tai joskus (yksi muutaman kerran vuodessa). Raati pääsi helposti yksimielisyyteen tärkeimmistä näytteitä erottelevista tekijöistä ja näytteiden skaalaus asteikolle tuli heiltä luonnollisesti yhteisen pohdinnan päätteeksi. Jokainen raatilainen osallistui kahteen koulutukseen ja kaikkiin arviointeihin. Koulutusten täsmällisyyden vuoksi voidaan ajatella että raati oli mahdollisimman luotettava ja toistamiskykyinen.

Toisena tutkimuksen osa-alueena oli probioottihiivan säilyvyyden tutkiminen oluessa. Mikrobiologilla mittauksilla todennettiin, miten *S. boulardii* käyttäytyy oluessa ja säilyykö se siinä kuluttajille saakka. Tutkimus täydentää kriittisesti puuttuvaa tietoa, sillä ainoastaan *S. boulardiilla* valmistetusta oluesta ei löytynyt lainkaan julkaisuja. Capecen ym. (2018) tutkimuksessa käytettiin kahta hiivaa, *S. cerevisiaen* ja *S. boulardiin* yhdistelmää startterina eikä *S. boulardiilla* ollut negatiivisia vaikutuksia oluen makuun, mutta kyseessä oli hiivojen yhdistelmä, joten tutkimus ei kerro ainoastaan *S. boulardiista* oluthiivana.

Hiivan määrä oli ensimmäisen kuukauden kohdalla suurin B37 näytteissä mutta toisen ja kolmannen kuukauden kohdalla sitä oli enemmän huoneenlämmössä käyneissä BRT näytteissä. Huomattavaa on, että BRT näytteen tulokset toisen kuukauden kohdalla poikkesivat huomattavasti muista, joten on mahdollista että niiden maljauksissa on käynyt pipetointi- tai laskuvirhe. Mahdollista on tietysti myös erot näytteiden välillä tai se, että hiiva on toisen kuukauden kohdalla onnistunut hajottamaan suuren määrän sokeria ravinnoiksi ja päässyt lisääntymään. Käymislämpötilan ja fermentointiaikojen jatkotutkimuksen tarve on ilmeinen, jotta *S. boulardii* hiivan optimikäymislämpötilasta saadaan lisää tietoa.

Kolmantena tutkimusalueena oli *S. boulardii* oluen teknologisista ominaisuuksista alkoholipitoisuus, pH ja väri, verrattuna perinteisellä oluthiivalla valmistettuun olueen. Alkoholipitoisuuksissa oli suuria eroja ja *S. boulardiin* kyky fermentoida jäi molemmissa lämpötiloissa *S. cerevisiaeta* matalammaksi, etenkin korkeammassa fermentointilämpötilassa, jossa näytteisiin tuli kaikista vähiten alkoholia. Osoittautui, että *S. boulardii* ei kyennyt fermentoimaan maltoosia 37 celsiusasteessa, mikä selittää B37 olueen alhaisen alkoholiprosentin.

Korkea maltoosipitoisuus kävi ilmi HPLC-mittausten tuloksista, vaikka tutkimuksessa ei ollut tarkoitus keskittyä oluen sokeripitoisuuteen. Korkealla jäännössokerilla ja matalalla alkoholipitoisuudella on kuitenkin ilmeinen yhteys, joten fermentointiaikojen vaikutuksesta tarvittaisiin edelleen lisää tietoa. Tekniseksi ongelmaksi muodostui myös B37 näytteen voimakas kuohunta, jonka vuoksi oluesta kuohui suuri määrä hävikkiin, vaikka pulloja käsiteltiin varoen. Mahdolliseksi syyksi kuohuntaan on se, että olueen oli syntynyt paljon hiilidioksidia, kun hiiva ei ollut pystynyt hyödyntämään maltoosia 37 °C käymisprosessissa, mutta kylläkin, kun olut siirrettiin viileämpään.

pH-arvoissa oli vain pieniä eroja, eivätkä ne heijastuneet aistinvaraiseen tutkimukseen, jossa arvioitiin näytteiden hapanta makua. Kaikki olutnäytteet jäivät selkeästi vähemmän happamiksi kuin esimerkiksi virvoitusjuomat, joiden pH-arvo vaihtelevat 2,6–4,0 välillä (Montanari ym. 2019). Huoneenlämmössä käyneitä näytteitä, käytetystä hiivasta huolimatta, yhdisti tunkkainen maku ja kaupallista olutta lukuunottamatta tumma väri. Aistiprofiilissa tuotteiden välillä ei ollut eroa sameudessa mutta maun puolesta tunkkaisen makuisiksi arvioidut näytteet BRT ja CRT olivat myöskin värisävyiltään tummempia, mikä kertoo siitä että tummalla värisävyllä ja tunkkaisuudella todettiin yhteys. Yleisesti tummia oluita pidetään raskaampina kuin kirkkaampia oluita, joten kyse voi olla opitun yhteyden ja tottumuksen mahdollisuudesta.

Oluen hyllyikä on noin kuudesta yhdeksään kuukautta, riippuen olutlajista ja humaloinnista (Stewart 2016). Tutkittavaksi valikoitui vehnäolut, sillä se on usein suodattamaton ja olisi sen ansiosta hyvä pohja oluelle, johon hiiva halutaan jättää. Probioottisen ominaisuuden rajana pidetään Ishibashi ja Shimamurin (1993) mukaan  $10^7$  pitoisuutta ja se toteutui kaikissa näytteissä. Tutkimuksen tulokset ovat mielenkiintoinen alku probioottisen oluen kehittämiseksi, joka voi tulevaisuudessa olla kulutetuimpia funktionaalisia elintarvikkeitamme.

Huoneenlämmössä fermentoidun BRT näytteen tulokset toisen kuukauden kohdalla poikkesivat merkittävästi muista tuloksista joten niiden luotettavuus voidaan kyseenalaistaa. Kyseessä saattoi olla pipentointi- tai laskuvirhe. Juomilla, joissa on alkoholia yli 1.2 %, ei saa olla terveys- tai ravitsemusväitettä (EY N:o 1984/2006). Olisiko alkoholiton probioottinen olut vaihtoehto alkoholiselle probioottioluelle?

## 4 PÄÄTELMÄT

Tutkimuksen tuloksena saatiin tieto siitä, että *S. boulardiilla* valmistettu ja 37 asteessa fermentoitu olut käyttäytyi aistinvaraisessa tutkimuksessa hyvin kaupallisen oluen tavoin kertoo sen potentiaalista. Näytteistä B37 ei eronnut tilastollisesti referenssioluesta ja siinä oli viimeisenkin kuukauden kohdalla jäljellä probioottista hiivaa. Olut oli myöskin kirkas ja vaalean värinen kuten kaupallinen olut sekä siihen muodostui kestävä vaahto. Kysymykseksi jää olueen jäänyt matala alkoholipitoisuus ja fermentointilämpötilojen tutkiminen. Jatkotutkimuksen tarpeena on tutkia ensisijaisesti probiootthiivalla valmistetun oluen käymisprosessin lämpötilojen vaikutus olueen. Käymisaikoja muokkaamalla voisi tutkia, mikä on *S. boulardiille* oluen kuohunnan sekä aistinvaraisten ominaisuuksien kannalta ideaalisin prosessi. Toisaalta juomilla, joissa on alkoholia yli 1.2 % ei saa olla terveys- tai ravitsemusväitettä, joten alkoholittoman *S. boulardii* -oluen reseptin jatkokehitystä ei kannata unohtaa.

Probiootthiivalla valmistetusta oluesta tarvitaan vielä paljon lisää tutkimustietoa. Ensisijaisesti olisi hyvä täydentää tietoa siitä, missä lämpötilassa *S. boulardii* fermentoi ja sen jälkeen voisi kartoittaa kuluttajien kiinnostusta tuotteeseen. *S. boulardii* oluella voisi tehdä aistinvaraisin menetelmin myös kuluttajatutkimuksen ja hyväksyttävyysskyselyn. Miellyttävyystudkimus eri resepteistä voisi tuoda myös ensiarvoisen tärkeää tietoa tuotteesta ennen kaupallistamista.

## LÄHDELUETTELO

- Barth R. 2013. The chemistry of beer: The science in the Suds. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 1 online resource (350s) Saatavilla: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/helsinki-ebooks/detail.action?docID=1368917>  
Viitattu 27.11.2019
- Capece A, Romaniello R, Pietrafesa A, Siesto G, Pietrafesa R, Zambuto M, Romano P. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. Int J Food Microbiol. 2018 Nov 2; 284:22-30. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.028. Epub 2018 Jul 2.
- Cutting SM. 2011. *Bacillus* probiotics. Food Microbiol 28(2):214-20.
- Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1831/2003. 2003. Asetus elintarvikkeita koskevista ravitsemus- ja terveysväitteistä. Saatavilla: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/?uri=URISERV%3A121306> Luettu 28.11.17
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization and World Health. Organization Expert Consultation. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. 2006. Saatavilla: <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf> Luettu: 19.12.2019.
- Fimea 2018. Precosa lääkevalmisteyhteenvedo. Saatavilla: <http://spc.fimea.fi/index/nam/html/nam/humspc/7/99757.pdf> Luettu 12.12.2019.
- Flatley E, Wilde A, Nailor M. 2015. *Saccharomyces boulardii* for the prevention of hospital onset *Clostridium difficile* Infection. J Gastrointest Liver Dis, Vol. 24 No 1: 21-24. Saatavilla: <http://dx.doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.fly> Luettu 13.12.2019.
- Ishibashi N, Shimamura S. Bifidobacteria: Research and development in Japan. Food Technol 47:126-135. 1993
- Josephsen J, Jespersen J. Starter Cultures and Fermented Product, Teoksessa: Hui YH, Meunier-Goddik L, Josephsen J, Nip W-K, Stanfield PS, Toldrá F, toim. Handbook of Food and fermentation technology. Marcel Dekker, New York. 2004: 23-49.
- Jääntti J, Korhola M, Ruohonen L. Hiivat ja homeet. Teoksessa: Timonen S, Valkonen J (toim.) Sienten biologia. 2. Painos. Gaudeamus, Helsinki. 2018: 291-319.
- Karonen T, Mustalammi V, Villikka K, Ruokoniemi P. *Saccharomyces boulardii* -lääkevalmisteiden käyttöä on rajattu ja varoituksia lisätty. Sic! Lääketietoa Fimeasta. 2/2018.  
Saatavilla: <https://sic.fimea.fi/verkkolehdet/2018/2018/vain-verkossa/saccharomyces-boulardii-laakevalmisteiden-kayttoja-on-rajattu-ja-varoituksia-lisatty> Luettu 12.12.2019
- Kaukinen M, Nylund M, Siikala P. Alkoholijuomien käsikirja 1. 5.p. Restamark, Uudenkaupungin kirjapaino Oy 1995. 263 s.
- Kunze W. 1999. Technology brewing and malting. VLB. Berlin. English translation of the 7<sup>th</sup>, revised edition of Technologie Brauer und Mälzer. 726 s.
- Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. 2011. The yeasts: a taxonomic study. 5.p. Elsevier.
- Miettinen S-M, Tuorila H, 2016. Eettiset näkökohdat aistinvaraisessa tutkimuksessa. Teoksessa: Tuorila H, Appelby U, toim. Elintarvikkeiden aistinvaraiset tutkimusmenetelmät. 2. painos. Helsinki: Gaudeamus.
- Montanari C, Tabanelli G, Zamagna I, Barbieri F, Gardini A, Ponzetto M, Redaelli E, Gardini F. 2019. Modeling of yeast thermal resistance and optimization of the pasteurization treatment applied to soft drinks, International Journal of Food Microbiology, Volume 301, 2019, Pages 1-8, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.04.006>
- Nathanail AV, Gibson B, Han L, Peltonen K, Ollilainen V, Jestoi M, Laitila A. 2016. The lager yeast *Saccharomyces pastorianus* removes and transforms *Fusarium trichothecene* mycotoxins during fermentation of brewer's wort. Food Chemistry 203:448-55.

OEPM Oficina Española de Patentes y Marcas 2020. Saatavilla: [http://www.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/58/31/ES-2583178\\_A1.pdf](http://www.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/58/31/ES-2583178_A1.pdf) Luettu 9.1.2020

Patel D, Walker M. Semisolid Cultured Dairy Products: Principles and Applications, Teoksessa: Hui YH, Meunier-Goddik L, Josephsen J, Nip W-K, Stanfield PS, Toldrá F, toim. Handbook of Food and Fermentation Technology. Marcel Dekker, New York. 2004: 113-124.

Possemiers S, Marzorati M, Verstraete W, Van de Wiele T. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. International Journal of Food Microbiology 2010, 141:97–103.

Rijkers G, de Vos W, Brummer RJ, Morelli L, Corthier G, Marteau P. Horizons in Nutritional Science. Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. British Journal of Nutrition, 2011, 106:1291–1296 doi:10.1017/S000711451100287X

Rodhouse L, Carbonero F, 2017. Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 14, 1–12. Saatavilla: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2017.1378616> Luettu: 31.1.2019.

Stanton C, Desmond C, Coakley M, Collins J, Fitzgerald G, Ross P. Challenges Facing Development of Probiotic-Containing Functional Foods, Teoksessa: Handbook of Fermented Functional Foods, toim. Farnworth ER. CRC Press 2003. 27-49.

Stewart GG, 2016. Stability and Shelf Life of Food (2nd Edition) – 10 Beer Shelf Life and Stability. 293-390. Elsevier. Subramaniam, Persis. Saatavilla: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00CRSG94/stability-shelf-life/physical-instability> Luettu 11.2.2020

Swieca M, Kordowska-Wiater M, Pytko M, Gawlik-Dziki U, Seczyk L, Złotek U, Kapusta I. 2019. Nutritional and pro-health quality of lentil and adzuki bean sprouts enriched with probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. LWT 100220-6.

Tuorila H, Appelby U. 2005. Aistinvarainen tutkimus: tieteenala ja käyttöalueet. Teoksessa: Tuorila H, Appelby U, toim. Elintarvikkeiden aistinvaraiset tutkimusmenetelmät. 2. painos. Helsinki: Gaudeamus.

van der Aa Kühle, Skovgaard K, Jespersen L. 2005. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. Int J Food Microbiol 101(1):29-39

## **LIITTEET**

1. Raadin rekrytointilomake
2. Taustatietolomake
3. Suostumuslomake
4. Sanastonluontilomake kuvailevaan analyysiin
5. HPLC-ajon tulokset näytteistä (4 sivua)

**Liite 1. Raadin rekrytointilomake****Etsitään osallistujia oluen aistinvaraiseen tutkimukseen!**

Tervetuloa mukaan aistinvaraiseen oluttutkimukseen, joka järjestetään 13.3.-21.3.2018 Helsingin yliopiston Viikin kampuksella, aistinvaraisen tutkimuksen laboratoriossa EE-talon toisessa kerroksessa (Agnes Sjöbergin katu 2). Tutkimus tulee olemaan osa maisterintutkielmaani.

Tutkimus on koulutetun raadin suorittama arviointi. Raatiin mahtuu 12 jäsentä ja jäsenten tulee olla täysi-ikäisiä. Tutkimukseen osallistuminen edellyttää sitoutumista kolmeen raadin koulutuskertaan sekä kahteen arviointiin. Sinulla ei tarvitse olla aikaisempaa kokemusta aistinvaraisesta arvioinnista. Osallistumisesta saat tuotepalkinnon sekä FOOD-116 kurssilaisilla on lisäpistemahdollisuus (5 lisäpistettä).

**Koulutus**

1. Koulutus ti 13.3 kello 10.15-11.45
2. Koulutus to 15.3 kello 10.15-11.45
3. Koulutus ma 19.3 kello 10.15-11.45

**Arvioinnit**

1. Arviointi ti 20.3 kello 11-13 välillä (kesto noin 30 minuuttia)
2. Arviointi ke 21.3 kello 11-13 välillä (kesto noin 30 minuuttia)

Koulutuskerrat kestävät reilun tunnin verran ja yhteen arviointiin kannattaa varata aikaa noin 30 minuuttia. Huomioithan, että arvioitavana on pieniä määriä mietoja alkoholijuomia, jotka voivat vaikuttaa kykyyn ajaa autoa, operoida työkoneita tai suorittaa tarkkuutta vaativia tehtäviä. Olutnäytteitä ei välttämättä tarvitse niellä. Tuotteet voivat sisältää vehnää ja gluteenia.

**Ilmoittaudu mukaan e-lomakkeella:**

<https://elomake.helsinki.fi/lomakkeet/87112/lomake.html>

Kaikissa kysymyksissä voit olla yhteydessä osoitteeseen: [anna.liljeroos@helsinki.fi](mailto:anna.liljeroos@helsinki.fi)

Anna Liljeroos  
Elintarviketieteiden kandidaatti  
050 5533 444



## Liite 2. Suostumuslomake aistinvaraiseen tutkimukseen

Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos  
PL 66 (Agnes Sjöbergin katu 2)  
00014 Helsingin yliopisto

### KOEHENKILÖN SUOSTUMUS OSALLISTUA AISTINVARAISEEN TUTKIMUKSEEN

#### Aistinvarainen tutkimus - yleiset periaatteet

Elintarvikkeiden aistinvaraisella tutkimuksella kerätään tietoa elintarvikkeiden ominaisuuksista tai vastaajien suhtautumisesta niihin. Tietoa kerätään aistien avulla: katsomalla, tunnustelemalla, haistamalla ja maistamalla elintarvikenäytteitä tai niiden aineosia. Kokeen alussa kerromme tutkimuksen tarkoituksen koehenkilöille siten kuin on mahdollista olematta johdatteleva. Kokeen jälkeen järjestämme palautetilaisuuden, jossa kerrotaan tavoitteista ja tuloksista. Jos koehenkilö ei pääse palautetilaisuuteen, hän voi pyytää tietoja sähköpostitse tai kirjeitse. Laboratoriossamme arvioitavat elintarvikkeet ja niiden aineosat täyttävät elintarvikelainsäädännön vaatimukset. Kaikkea tutkittavilta kerättyä aineistoa käsitellään ehdottoman luottamuksellisesti.

#### Suostumuksen yleisperiaate

Tällä suostumuksella koehenkilö lupautuu noudattamaan kokeessa annettuja ohjeita mahdollisimman tarkkaan. Koehenkilöllä on oikeus kieltäytyä kokeesta. Koehenkilöllä on oikeus keskeyttää osallistumisensa seuraamuksitta ja syytä ilmoittamatta. Keskeyttämistä ei tarvitse perustella eikä keskeyttäminen vaikuta keskeyttäjän kohteluun. Keskeyttäneen koehenkilön tietoja ei käytetä tutkimusaineiston analyysissä.

#### Tietoja tutkimuksesta, johon koehenkilö suostuu allekirjoittaessaan tämän suostumuksen

Tutkimuksen nimi: Oluen aistinvarainen analyysi koulutetulla raadilla, maisterintutkielma Anna Liljeroos

Aikaväli, jolla kokeet tehdään: 13.3.-21.3.2018

Näytteiden laatu ja määrä: olut, 5 näytettä (näytteet sisältävät alkoholia)

Näytteiden nieleminen: Ei

Koekertojen (sessioiden) määrä: 5

Mahdollisesti allergiaa tai yliherkkyyttä aiheuttavat aineosat: gluteeni, hiiva, vehnä

Tutkimuksen vastuullinen tutkija: Yliopistonlehtori Antti Knaapila

Vastuullisen tutkijan yhteystiedot: antti.knaapila@helsinki.fi, puh. 050 316 5908

#### Suostumus

Olen saanut riittävät tiedot tästä tutkimuksesta ja olen ymmärtänyt tiedon ja suostun toimimaan koehenkilönä tässä tutkimuksessa. Olen ilmoittanut ruoka-aineallergiani.

Olen täysi-ikäinen ☐

Helsingissä \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.201\_\_\_\_\_

Sähköpostiosoite: \_\_\_\_\_ Puhelin: \_\_\_\_\_

Ruoka-aineallergiani: \_\_\_\_\_

---

Allekirjoitus

Nimenselvennös

**Liite 3. Koulutetun raadin taustatietolomake**

## Taustatietolomake

Ole hyvä ja rastita vaihtoehto.

Sukupuoli Nainen ( ) Mies ( ) Muu ( ) En halua vastata ( )

Ikä \_\_\_\_\_-vuotta En halua kertoa ( )

Olen opiskelija ( ) Yliopiston henkilökuntaa ( ) Muu ( )

Kuinka usein nautit olutta?

- ( ) Viikoittain tai useammin
- ( ) Kuukausittain
- ( ) Muutaman kerran vuodessa
- ( ) Vuosittain tai harvemmin

Kuinka usein valitset vehnäoluen nauttiessasi olutta?

- ( ) Usein
- ( ) Joskus
- ( ) Harvoin
- ( ) En koskaan

Oletko aikaisemmin osallistunut aistinvaraiseen tutkimukseen? Kuluttajatutkimus tai koulutettu raati.

- ( ) Kyllä molempiin
- ( ) Kyllä vain toiseen. Kumpaan? \_\_\_\_\_
- ( ) En ole aikaisemmin osallistunut aistinvaraiseen tutkimukseen

Tässä voit antaa sanallista palautetta koskien näytteitä tai tutkimuksen järjestämistä ja kulua. Jätä näytenumero jos haluat antaa palautetta koskien jotain yksittäistä näytettä.

---

---

---

Kiitos osallistumisestasi ja palautteestasi!

## Liite 4. Sanastonluontilomake kuvailevaan analyysiin

### Ominaisuuksien kuvailu (kuvaileva analyysi)

Arvioijan nimi: \_\_\_\_\_ Päivämäärä: \_\_\_\_\_

Tarkastele annettuja näytteitä katselemalla, haistamalla, tunnustelemalla sormin/lusikalla ja suussa ja maistamalla. **Kuvaile näytteiden ulkonäköä, hajua (aromia), rakennetta/suutuntumaa ja makua/flavoria (tässä järjestyksessä) mahdollisimman monella sanalla.** Pyri kiinnittämään huomiota näytteissä esiintyviin **eroihin**. Samojen ominaisuuksien ei tarvitse löytyä eri näytteistä. **Älä käytä mieltymystä kuvaavia sanoja** (esimerkiksi ”hyvä”, ”maukas” tai ”epämiellyttävä”).

Näyte: _____	Näyte: _____	Näyte: _____
Ulkonäkö:	Ulkonäkö:	Ulkonäkö:
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
Haju (ortonasaali):	Haju (ortonasaali):	Haju (ortonasaali):
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
Rakenne ja suutuntuma:	Rakenne ja suutuntuma:	Rakenne ja suutuntuma:
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
Maku/flavori:	Maku/flavori:	Maku/flavori:
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
Muuta huomioitavaa:	Muuta huomioitavaa:	Muuta huomioitavaa:
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

**Liite 5. HPLC-ajon tulokset näytteistä**



# Ethanol\_Hans Report

Reported by User: Vitamins (Vitamins)

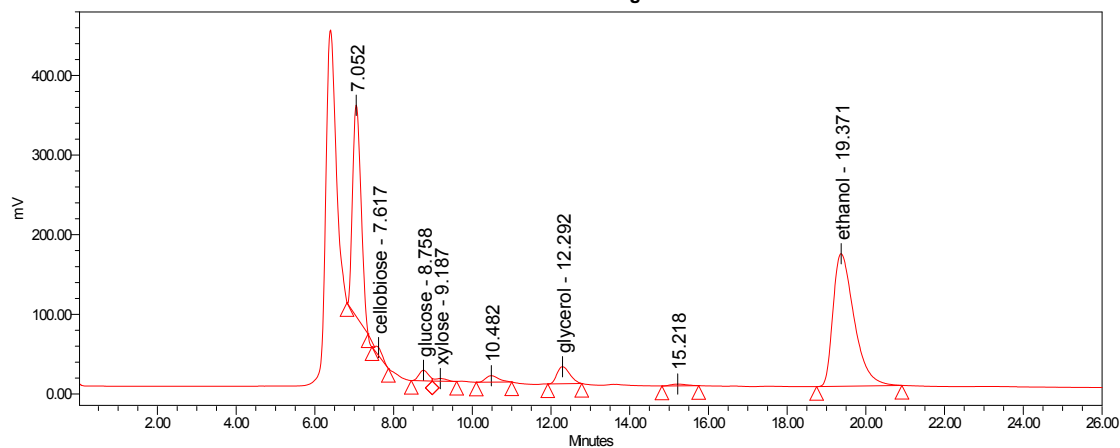
Project Name: HapSo

## SAMPLE INFORMATION

Sample Name: 12  
 Sample Type: Unknown  
 Vial: 78  
 Injection #: 1  
 Injection Volume: 20.00 ul  
 Run Time: 26.0 Minutes  
 Sample Set Name: Hans\_Hapso\_20180227

Acquired By: Vitamins  
 Date Acquired: 4/12/2018 1:47:34 AM EEST  
 Acq. Method Set: Hapso PDARI  
 Date Processed: 4/12/2018 11:39:23 AM EEST  
 Processing Method: ETHANOL2018  
 Channel Name: SATIN  
 Proc. Chnl. Descr.:

### Auto-Scaled Chromatogram



### Processed Channel:

Peak Name	Retention Time (min)	Area	Height	Amount	Units
1	7.052	3952894	265626		
2	cellobiose - 7.617	128448	10045	0.235	3
3	galacturonate - 8.433				
4	glucose - 8.758	220308	13231	0.417	3
5	xylose - 9.187	70900	3259	0.283	3
6	10.482	188611	8171		
7	glycerol - 12.292	482170	21434	0.876	3
8	acetate - 13.630				
9	15.218	62560	2231		
10	methanol - 16.892				
11	ethanol - 19.371	6184432	166598	24.737	3



## Ethanol\_Hans Report

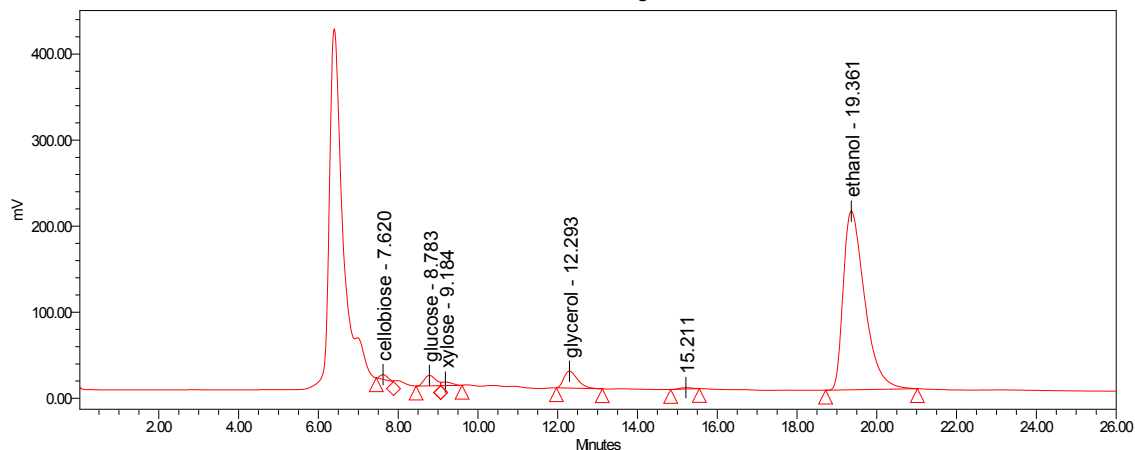
Reported by User: Vitamins (Vitamins)

Project Name: HapSo

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	13	Acquired By:	Vitamins
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	4/12/2018 2:14:34 AM EEST
Vial:	79	Acq. Method Set:	Hapso PDARI
Injection #:	1	Date Processed:	4/12/2018 11:42:19 AM EEST
Injection Volume:	20.00 ul	Processing Method:	ETHANOL2018
Run Time:	26.0 Minutes	Channel Name:	SATIN
Sample Set Name:	Hans_Hapso_20180227	Proc. Chnl. Descr.:	

### Auto-Scaled Chromatogram



### Processed Channel:

	Peak Name	Retention Time (min)	Area	Height	Amount	Units
1	cellobiose	7.620	76366	5514	0.159	3
2	galacturonate	8.433				
3	glucose	8.783	243758	12187	0.450	3
4	xylose	9.184	74069	4007	0.287	3
5	glycerol	12.293	470536	19581	0.857	3
6	acetate	13.630				
7		15.211	36181	1637		
8	methanol	16.892				
9	ethanol	19.361	7731597	207752	30.823	3



## Ethanol\_Hans Report

Reported by User: Vitamins (Vitamins)

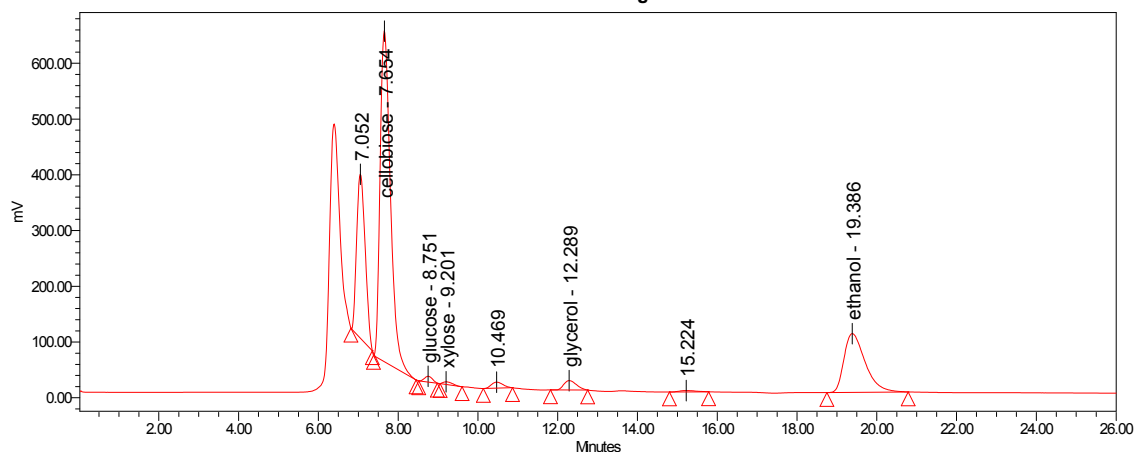
Project Name: HapSo

## SAMPLE INFORMATION

Sample Name: 14  
 Sample Type: Unknown  
 Vial: 80  
 Injection #: 1  
 Injection Volume: 20.00 ul  
 Run Time: 26.0 Minutes  
 Sample Set Name: Hans\_Hapso\_20180227

Acquired By: Vitamins  
 Date Acquired: 4/12/2018 2:41:35 AM EEST  
 Acq. Method Set: Hapso PDARI  
 Date Processed: 4/12/2018 11:43:56 AM EEST  
 Processing Method: ETHANOL2018  
 Channel Name: SATIN  
 Proc. Chnl. Descr.:

## Auto-Scaled Chromatogram



## Processed Channel:

	Peak Name	Retention Time (min)	Area	Height	Amount	Units
1		7.052	4383778	294520		
2	cellobiose	7.654	10650268	593788	15.522	3
3	galacturonate	8.433				
4	glucose	8.751	146660	10408	0.311	3
5	xylose	9.201	80216	4756	0.295	3
6		10.469	217789	10847		
7	glycerol	12.289	367418	16735	0.685	3
8	acetate	13.630				
9		15.224	70177	2434		
10	methanol	16.892				
11	ethanol	19.386	3869770	105375	15.630	3



## Ethanol\_Hans Report

Reported by User: Vitamins (Vitamins)

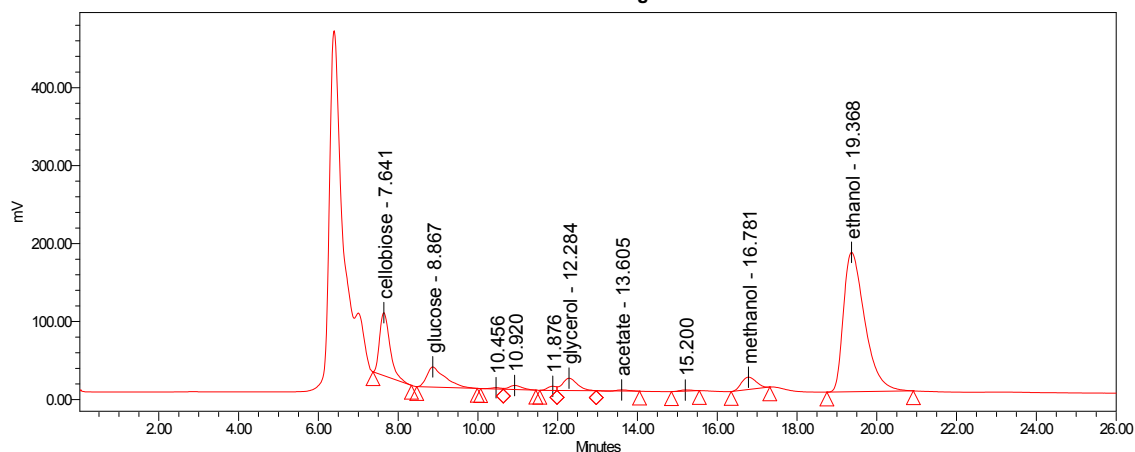
Project Name: HapSo

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name: 15  
 Sample Type: Unknown  
 Vial: 81  
 Injection #: 1  
 Injection Volume: 20.00 ul  
 Run Time: 26.0 Minutes  
 Sample Set Name: Hans\_Hapso\_20180227

Acquired By: Vitamins  
 Date Acquired: 4/12/2018 3:08:38 AM EEST  
 Acq. Method Set: Hapso PDA RI  
 Date Processed: 4/23/2018 12:36:49 PM EEST  
 Processing Method: ETHANOL2018  
 Channel Name: SATIN  
 Proc. Chnl. Descr.:

### Auto-Scaled Chromatogram



### Processed Channel:

	Peak Name	Retention Time (min)	Area	Height	Amount	Units
1	cellobiose	7.641	1463485	80923	2.174	3
2	galacturonate	8.433				
3	glucose	8.867	818758	25929	1.277	3
4	xylose	9.457				
5		10.456	30450	1668		
6		10.920	118904	5188		
7		11.876	80018	5261		
8	glycerol	12.284	409577	15780	0.756	3
9	acetate	13.605	34681	1372	0.150	g/L
10		15.200	32420	1475		
11	methanol	16.781	405838	15843	4.615	g/L
12	ethanol	19.368	6626680	178796	26.476	3